

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e
Obstetrícia

**Sistema Caliceína-Cininas e Estresse Oxidativo na Infertilidade
Feminina Induzida por Cisplatina**

Laura Silveira Ayres

Porto Alegre, 2018

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e
Obstetrícia

**Sistema Caliceína-Cininas e Estresse Oxidativo na Infertilidade
Feminina Induzida por Cisplatina**

Laura Silveira Ayres

Orientador: Prof^a Dra. Elizabeth Obino Cirne Lima

Tese apresentada como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor
no Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde: Ginecologia e
Obstetrícia, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Ayres, Laura Silveira
Sistema Calicreína-Cininas e Estresse Oxidativo na
Infertilidade Feminina Induzida por Cisplatina /
Laura Silveira Ayres. -- 2018.
68 f.
Orientadora: Elizabeth Obino Cirne-Lima.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. modelo de infertilidade. 2. quimioterapia. 3.
citocinas inflamatórias. 4. toxicidade ovariana. I.
Cirne-Lima, Elizabeth Obino, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e avós, por todo o seu esforço para que eu tivesse acesso ao estudo e por me estimularem a sempre ir mais longe.

À minha irmã Juliana, por ser uma grande amiga com quem sempre posso contar.

Ao meu marido Winícius, por me apoiar sempre, nos momentos bons e nas dificuldades e me estimular a alcançar os meus objetivos com determinação.

À minha orientadora Elizabeth Cirne Lima e ao professor Eduardo Passos, por me acolherem no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, por me darem grandes oportunidades de aprendizado acadêmico, profissional e lições de vida.

Às colegas do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, especialmente à Paula, à Isabel, à Cristiana, à Tuane, à Fernanda Oliveira à Bruna, à Gabriela e à Martina, além de tantas outras colegas que estiveram sempre disponíveis a ajudar, indo até mesmo nos finais de semana me acompanhar nos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Farmacológica, pela parceria neste projeto.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Experimental, que se mostraram sempre dispostos a ajudar e permitiram que esse estudo fosse realizado, em especial à enfermeira Marta e às veterinárias da Unidade de Experimentação Animal, à Flavia, à Emily e à Francine, da Unidade de Patologia Experimental, ao Everaldo e à Pati Lu.

E a todos que de alguma maneira fizeram parte da minha trajetória durante os quatro anos do doutorado, pelo convívio, pela parceria e por todo o auxílio que recebi.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DA LITERATURA.....	4
1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	4
2 Marco Conceitual	6
3 Ciclo Reprodutivo e Ovulação	8
4 Proteína Ki-67	11
5 Efeitos Tóxicos da Cisplatina no Tecido Ovariano	12
5.1 Estresse oxidativo induzido pela cisplatina	13
5.2 Citocinas Inflamatórias e a Ação da Cisplatina	14
6 Sistema Caliceína-Cininas	15
6.1 Cininas, Maturação Folicular e Ovulação.....	17
7 Radicais Livres e Inflamação	18
7.1 Óxido Nítrico	18
7.2 Superóxido Dismutase (SOD)	21
7.3 Glutathione.....	22
JUSTIFICATIVA.....	24
HIPÓTESES	25
OBJETIVOS.....	26
Principal	26
Específicos.....	26
REFERÊNCIAS	27
ARTIGO EM INGLÊS.....	31
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
PERSPECTIVAS	55

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas em Inglês

ACE	Angiotensin converting enzyme – enzima conversora de angiotensina
ADP	Adenosine diphosphate - Adenosina difosfato
AMH	Anti-Müllerian hormone - Hormônio anti-Mülleriano
AMPc	Cyclic adenosine monophosphate – Adenosina monofosfato cíclica
ATP	Adenosine triphosphate – Adenosina trifosfato
bFGF	Basic fibroblast growth factor - Fator de crescimento de fibroblastos básico
BK	Bradykinin - bradicinina
BKB1R	Bradykinin receptor 1 - Receptor da bradicinina B1R
BKB2R	Bradykinin receptor 2 - Receptor da bradicinina B2R
BMP15	Bone morphogenetic protein 15 - Proteína morfogenética óssea 15
CPM	Carboxypeptidase M - carboxipeptidase M
CPN	Carboxypeptidase N - carboxipeptidase N
DABK	des-Arg ⁹ -Bradykinin
DAKD	des-Arg ¹⁰ -Kallidin
DNA	Deoxyribonucleic acid - Ácido desoxirribonucleico
EGF	Epidermal growth factor - Fator de crescimento epidermal
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase – Sintase de óxido nítrico endotelial
FSH	Follicle stimulating hormone - Hormônio folículo-estimulante
GDF9	Growth/differentiation factor 9 - Fator de crescimento e diferenciação 9
GFP	Green fluorescent protein – Proteína verde fluorescente
GnRH	Gonadotropin releasing hormone - Hormônio liberador de gonadotrofinas
GSH	Reduced glutathione - Glutathiona reduzida

GSSG	Oxidized glutathione - Glutathiona oxidada
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1 - Molécula de adesão intercelular-1
iNOS	Inducible nitric oxide synthase – Sintase de óxido nítrico induzível
KD	Kallidin - calidina
LH	Luteinizing hormone - Hormônio luteinizante
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1 - Proteína quimioatrativa de monócitos 1
mRNA	Messenger ribonucleic acid – Ácido ribonucleico mensageiro
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NEP	Neutral endopeptidase - endopeptidase neutra
NF- $\kappa\beta$	Nuclear factor $\kappa\beta$ - Fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$
nNOS	Neuronal nitric oxide synthase – Sintase de óxido nítrico neuronal
NO	Nitric oxide - Óxido nítrico
NOS	Nitric oxide synthase – Sintase de óxido nítrico
PARP-1	Poly [Adenosine diphosphate-ribose] polymerase 1 - Poli [adenosina difosfato-ribose] polimerase 1
PCOS	Polycystic ovary syndrome - síndrome dos ovários policísticos
RNA	Ribonucleic acid - Ácido ribonucleico
RNOS	Reactive nitrogen oxide species - espécies reativas de óxido de nitrogênio
ROS	Reactive oxygen species - espécies reativas de oxigênio
TLRs	Toll-like receptors - Receptores tipo toll
TNF- α	Tumor necrosis factor α - Fator de necrose tumoral α
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1 - Molécula de adesão celular vascular-1

Abreviaturas em Português

APM	Alto peso molecular
APN	Aminopectidase N
APP	Aminopectidase P
BPM	Baixo peso molecular
c-Kit	Receptor tirosina quinase c-Kit
DPPIV	Dipeptidilpeptidase IV
ECA	Enzima conversora de angiotensina
HNO ₂	Ácido nitroso
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL-10	Interleucina 10
IL-33	Interleucina 33
IL-8	Interleucina 8
IRA	Insuficiência renal aguda
Kg	Kilogramas
mg	Miligramas
mL	Mililitros
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetros
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
SCC	Sistema caliceína-cininas
SOD	Superóxido dismutase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação diagramática dos reguladores e tempos de desenvolvimento dos folículos.....	9
Figura 2: Geração e metabolismo das cininas.....	16
Fig. 1 Estrus cycle before treatment	45
Fig. 2 Estrus cycle after treatment	46
Fig. 3 Hematoxylin and eosin stained ovaries.....	47
Fig. 4 Ki67 immunohistochemistry 200x magnification	48
Fig. 5 Activated partial thromboplastin time and plasma kallikrein.....	49
Fig. 6 Interstitial and glandular kallikrein	50
Fig. 7 B1R and B2R expression and ovarian NO.....	51
Fig. 8 NAG and MPO concentrations.....	52
Fig. 9 SOD and GSH	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resultados das estratégias de busca na literatura.	5
Table 1 Body weight.....	44

RESUMO

Introdução: A toxicidade da cisplatina é bem compreendida nos sistemas renal, gastrointestinal, auditivo e nervoso, assim como na medula óssea. No entanto, os mecanismos causadores de infertilidade induzidos pela cisplatina são pouco compreendidos.

Objetivo: Nosso objetivo foi verificar a participação do sistema caliceína-cininas e do estresse oxidativo na infertilidade induzida pela cisplatina, auxiliando no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas.

Métodos: Os camundongos fêmeas C57BL/6 adultos (n=9) receberam dois ciclos de 2,5 mg/kg de cisplatina por via intraperitoneal durante cinco dias, com um período de recuperação de sete dias entre os ciclos. O grupo controle (n=9) recebeu solução de NaCl 0,9%. Foi feita a avaliação do ciclo estral e a contagem de folículos ovarianos. O marcador Ki67 foi avaliado por imunohistoquímica. Testes bioquímicos para caliceína plasmática, intersticial e glandular, tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), óxido nítrico (NO), superóxido dismutase (SOD), glutatona reduzida (GSH), mieloperoxidase (MPO) e N-acetil glucosaminidase (NAG); e Western-blot para os receptores de bradicinina B1R e B2R também foram realizados.

Resultados: Após o protocolo de cisplatina, 100% das fêmeas do grupo controle mantiveram a ciclicidade estral versus 44,4% das fêmeas do grupo cisplatina. O grupo controle apresentou maior número de folículos antrais (p=0,011) e folículos viáveis totais (p=0,006). O grupo cisplatina apresentou maior número de folículos atrésicos (p=0,014). O marcador Ki67 demonstrou semelhantes taxas de proliferação celular entre os grupos. Os marcadores inflamatórios foram aumentados no grupo cisplatina, incluindo a geração de caliceína plasmática (p=0,003), a diminuição do TTPa (p=0,02), o aumento da atividade da caliceína intersticial (p=0,002) e glandular (p=0,008) e na expressão dos receptores B1R (p=0,001) e B2R (p=0,001), MPO (p=0,03) e NAG (p=0,04). Os marcadores de estresse oxidativo também foram aumentados no grupo cisplatina, com maior produção de NO (p=0,01) e diminuição na SOD (p=0,003) e na GSH (p=0,01).

Conclusão: Todas as reações inflamatórias parecem ser ativadas pelo tratamento com cisplatina, exemplificadas pelo aumento da atividade da caliceína plasmática, intersticial e glandular, bem como a diminuição no TTPa e o aumento na expressão de B1R e B2R. A toxicidade mediada pela reação inflamatória da cisplatina é bem conhecida em seus efeitos colaterais, como ototoxicidade e nefrotoxicidade. Houve aumento da produção de NO nos ovários dos animais tratados, associado à indicação de menores concentrações de SOD e de GSH. Os desequilíbrios nos antioxidantes parecem contribuir para o estresse oxidativo ovariano. Quanto à MPO (neutrófilos) à NAG (macrófagos), a maior atividade de ambas no grupo cisplatina se explica pelo fato de que as células fagocíticas ativadas produzem

grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio, aumentando ainda mais o estresse oxidativo e a inflamação. O aumento da atividade do sistema caliceína-cininas e dos marcadores de estresse oxidativo no tecido ovariano propiciaram uma melhor compreensão da infertilidade induzida por cisplatina e indicam possíveis alternativas para proteção ovariana durante a quimioterapia, como inibidores do sistema caliceína-cinina e antioxidantes.

Palavras-chaves: modelo de infertilidade, quimioterapia, citocinas inflamatórias, toxicidade ovariana.

ABSTRACT

Background: Cisplatin toxicity is well understood in the renal, gastrointestinal, auditory and nervous systems, as well as in the bone marrow. However, the mechanisms causing infertility induced by cisplatin are poorly understood.

Purpose: Our objective was to verify the participation of the kallikrein-kinin system and oxidative stress in cisplatin-induced infertility, aiding in the development of new therapeutic alternatives.

Methods: C57BL/6 adult (n=9) female mice received two 2.5 mg/kg intra-peritoneal cycles of cisplatin for five days, with a seven-day recovery period between cycles. The control group (n=9) received 0.9% NaCl solution. The ovarian follicles were counted with hematoxylin and eosin staining. Ki67 marker was evaluated by immunohistochemistry. Biochemical tests for plasma, interstitial and glandular kallikrein, activated partial thromboplastin time (aPTT), nitric oxide (NO), superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH), myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl glucosaminidase (NAG); and Western blotting for the bradykinin B1R and B2R receptors were also performed.

Results: After cisplatin protocol, 100% of the females in the control group maintained estral cyclicity versus 44.4% of females in cisplatin group. The control group had a higher number of antral follicles (p=0.011) and total viable follicles (p=0.006). Cisplatin group had a higher number of atretic follicles (p=0.014). Ki67 marker demonstrated similar rates of cell proliferation between groups. Inflammatory markers were increased in cisplatin group, including plasma kallikrein generation (p=0.003), a decrease of aPTT (p=0.02), increased interstitial (p=0.002) and glandular (p=0.008) kallikrein, B1R (p=0.001) and B2R (p=0.001) expression, MPO (p=0.03) and NAG (p=0.04). Oxidative stress markers were also increased in cisplatin group, with higher NO production (p=0.01) and a decrease in SOD (p=0.003) and GSH (p=0.01).

Conclusion: All inflammatory reactions appear to be activated by cisplatin treatment, exemplified by increased plasma, interstitial and glandular kallikrein activity, as well as the decrease in aPTT and increased expression of B1R and B2R. The toxicity mediated by cisplatin inflammatory reaction is well known in its side effects, such as ototoxicity and nephrotoxicity. There was an increase in NO production in the ovaries of treated animals, associated with the indication of lower concentrations of SOD and GSH. Imbalances in antioxidants appear to contribute to ovarian oxidative stress. Regarding MPO (neutrophils) and NAG (macrophages), the greater activity of both in cisplatin group is explained by the fact that activated phagocytic cells produce large amounts of reactive oxygen species, further increasing oxidative stress and inflammation. Increased activity of the kallikrein-kinin system and markers of oxidative stress in ovarian tissue provided a better understanding of cisplatin-induced infertility

and indicate possible alternatives for ovarian protection during chemotherapy, such as inhibitors of the kallikrein-kinin system and antioxidants.

Keywords: infertility model, chemotherapy, inflammatory cytokines, ovarian toxicity.

INTRODUÇÃO

O tratamento para o câncer pode afetar as funções endócrina e reprodutiva. Como consequência, a perda da fertilidade é uma grande preocupação para os pacientes. Durante as últimas cinco décadas, grandes avanços no tratamento do câncer resultaram em um aumento substancial no número de pacientes jovens curados. O câncer afeta uma em cada 800 crianças e os dados sugerem que em torno de 80% desses pacientes estarão vivos 5 anos após o diagnóstico e que 70% serão sobreviventes a longo prazo. Com o aumento no número de sobreviventes em longo prazo, a função gonadal e a fertilidade se tornaram importantes preocupações para esses jovens (ANDERSON et al., 2015).

Os dados atuais sugerem que a gestação pós-tratamento não aumenta o risco de progressão do câncer para a maioria dos tumores. A ênfase então mudou da preservação da vida para a preservação da qualidade de vida. Atualmente, os serviços de preservação da fertilidade são raramente oferecidos ou até mesmo discutidos com o paciente antes do início da terapia para o câncer. Porém, demonstrou-se que os pacientes que receberam informações sobre sua saúde sexual e reprodutiva tiveram menores níveis de estresse psicológico que pacientes que não receberam essa informação (MAHAJAN, 2015).

Não há evidências de um efeito direto do câncer no sistema reprodutivo feminino. Exceto para os tipos de câncer que afetam diretamente esse sistema. Entretanto, seu tratamento pode ter vários efeitos adversos no trato reprodutivo. A exposição à quimioterapia ou à radioterapia diminui marcadamente o número de folículos presentes no ovário (DIEDRICH; FAUSER; DEVROEY, 2011). A destruição dos folículos pode causar falência ovariana prematura ou menopausa precoce. O tratamento com agentes alquilantes como a ciclofosfamida durante a adolescência aumenta em 9 vezes o risco de falência ovariana prematura. A ciclofosfamida parece exercer a sua toxicidade ovariana através da redução do número de folículos primordiais. Sugere-se que os tratamentos gonadotóxicos induzem um ciclo vicioso patofisiológico de destruição folicular. Ou seja, a depleção dos folículos reduz a secreção de estradiol e inibina, que causa um aumento nas concentrações

séricas de hormônio folículo-estimulante (Follicle stimulating hormone - FSH), que pode levar ao recrutamento de outros folículos, que também são destruídos pela quimioterapia (DIEDRICH; FAUSER; DEVROEY, 2011).

A falência ovariana prematura pós-quimioterapia ocorre com maior frequência nas pacientes com idade mais avançada. Modelos matemáticos sugerem que a exposição a tratamento gonadotóxico em idade mais jovem leva à perda de um número maior de folículos. Portanto, mulheres mais jovens tratadas para o câncer perdem mais anos de função ovariana normal. Entretanto, as pacientes com idade mais avançada têm uma menor reserva ovariana e um maior risco de desenvolverem falência ovariana durante ou após a quimioterapia. Apesar das mulheres mais jovens terem uma maior perda de folículos, elas têm maior probabilidade de manter ou recuperar a função menstrual (DIEDRICH; FAUSER; DEVROEY, 2011).

Diferentes opções para a preservação da fertilidade são propostas para as pacientes com câncer. A criopreservação de embriões é um procedimento bem estabelecido para preservar a fertilidade de mulheres em idade reprodutiva. Outra alternativa para esse grupo é a criopreservação de oócitos maduros. Por outro lado, a criopreservação de tecido ovariano é a única forma possível de preservação da fertilidade em pacientes pré-púberes e em mulheres que necessitam iniciar imediatamente o tratamento para o câncer (LUYCKX et al., 2014). Até o momento, foram publicados na literatura mais de 86 nascimentos após o autotransplante de tecido ovariano criopreservado (JENSEN et al., 2017). No entanto, o transplante de tecido ovariano criopreservado não pode ser realizado quando há um risco de reimplantação de células malignas, como no caso das pacientes com leucemia. Portanto, novas opções devem ser desenvolvidas para as situações em que o transplante não é recomendável (LUYCKX et al., 2014).

Dentre as possibilidades em estudo, estão a recuperação e autotransplante de células-tronco da linhagem germinativa e a utilização de fármacos capazes de proteger o tecido ovariano dos efeitos tóxicos dos quimioterápicos, sem prejudicar o tratamento contra o câncer e preservando a fertilidade. Porém, para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas,

é necessário que haja uma melhor compreensão sobre os efeitos da cisplatina nos marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo ovarianos.

REVISÃO DA LITERATURA

1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

A busca de artigos para a revisão da literatura foi realizada utilizando as bases de dados Pubmed, Lilacs e Google Acadêmico com as seguintes palavras-chaves: 1) *oxidative stress and ovary* 2) *oxidative stress and cisplatin* 3) *cisplatin and ovary* 4) *kallikrein and ovary* 5) *kallikrein and cisplatin*. A busca foi feita filtrando os resultados publicados nos últimos 5 anos (vide tabela 1).

Em relação ao termo *oxidative stress and ovary* foram encontrados 17.100 resultados no Google acadêmico. No Pubmed foram encontrados 1060 artigos. No Lilacs, foram encontrados 9 resultados. Em relação ao termo *oxidative stress and cisplatin*, foram encontrados 18.700 resultados no Google acadêmico, 1129 resultados no Pubmed e 4 resultados no Lilacs.

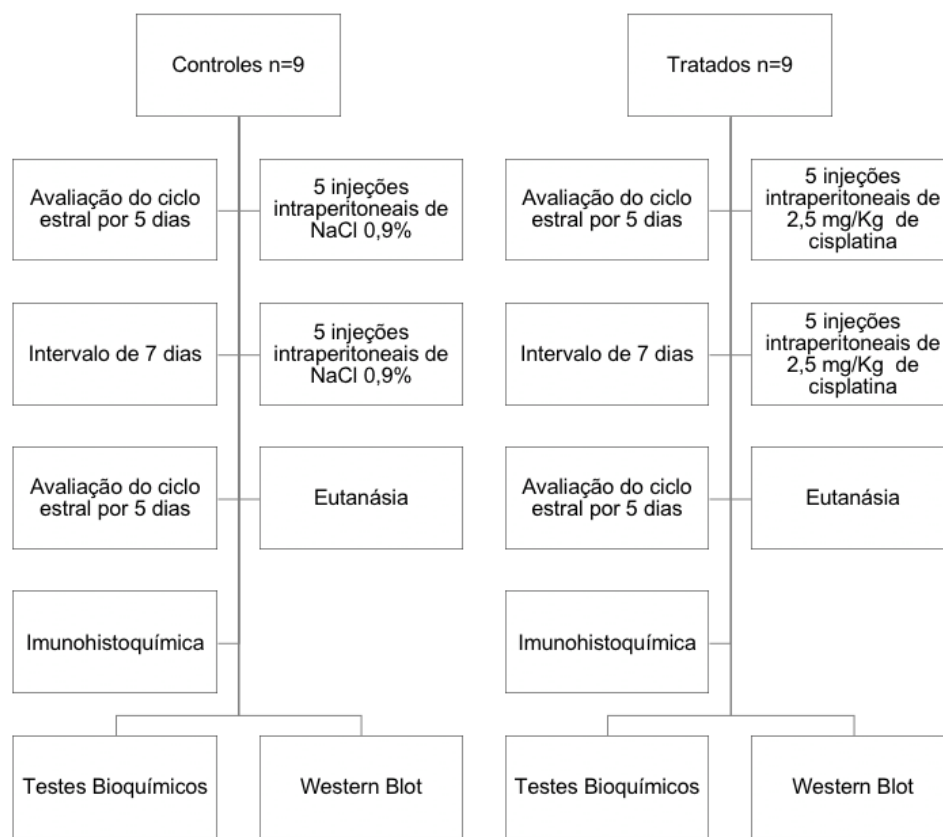
Cruzando as palavras-chaves *cisplatin* e *ovary*, foram encontrados 17.700 resultados no Google acadêmico, 172 resultados no Pubmed e 33 resultados no Lilacs. Ao se cruzar *kallikrein and ovary* foram encontrados 4.540 resultados no Google acadêmico, 129 resultados no Pubmed e 2 resultados no Lilacs. Em relação ao cruzamento das palavras-chaves *kallikrein and cisplatin*, foram encontrados 1.060 resultados no Google acadêmico, 5 resultados no Pubmed e não foram encontrados resultados no Lilacs.

A partir dessa busca na literatura, foram selecionados 31 artigos para o referencial teórico e 38 artigos como referências bibliográficas do manuscrito.

TABELA 1 - Resultados das estratégias de busca na literatura.

Palavras-chaves	Google acadêmico	Pubmed	Lilacs
oxidative stress and ovary	17.100	1060	9
oxidative stress and cisplatin	18.700	1129	4
cisplatin and ovary	17.700	172	33
kallikrein and ovary	4.540	129	2
kallikrein and cisplatin	1.060	5	-

2 Marco Conceitual



Foram utilizados camundongos fêmeas adultos com oito semanas de idade, C57BL/6 transgênicos para a proteína verde fluorescente (green fluorescent protein - GFP). Para a indução de infertilidade por quimioterapia, foi adotada uma modificação do protocolo descrito por Sawhney et al. (2005), que consiste em cinco aplicações diárias consecutivas intraperitoneais de 2,5 mg/Kg de cisplatina, seguidas por um intervalo de sete dias de recuperação (ciclo estral) e uma segunda série de 5 aplicações intraperitoneais de 2,5 mg/Kg de cisplatina em um grupo de 9 animais. O grupo controle (n=9) recebeu cinco aplicações diárias consecutivas intraperitoneais de NaCl 0,9% em um volume de aproximadamente 0,05 mL, seguidas por um intervalo de sete dias e uma segunda série de 5 aplicações intraperitoneais de NaCl 0,9%. Os animais foram pesados diariamente para avaliação do impacto do tratamento no peso corporal.

Após um intervalo de observação de cinco dias para a avaliação do ciclo estral, os animais foram eutanasiados. Um ovário de cada animal do grupo tratado com quimioterápico e do grupo controle foi fixado em paraformaldeído a 4%. Foram obtidos cortes histológicos dos ovários e estes foram corados com hematoxilina e eosina. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica para a contagem de folículos ovarianos. A fim de avaliar a presença do marcador de proliferação celular Ki67 (proteína nuclear Ki67), as amostras de ovários processadas em blocos de parafina foram seccionadas em cortes de 4 μm e analisadas por imunohistoquímica. O outro ovário de cada animal foi utilizado para determinar a atividade enzimática da calicreína (enzima responsável pela geração das cininas). A atividade de calicreína foi monitorada em ensaio cinético a 405 nm em espectrofotômetro após a adição de substrato cromogênico específico para a enzima (S2302, H-D-Pro-Phe-Arg-pNA). Os níveis de outros marcadores inflamatórios também foram determinados por ensaios bioquímicos (tempo de tromboplastina parcial ativada, óxido nítrico, superóxido dismutase, glutatona reduzida, N-acetil glicosaminidase e mieloperoxidase). Os níveis de expressão dos receptores de cininas B1R e B2R foram determinados pela técnica de Western-blot.

3 Ciclo Reprodutivo e Ovulação

Em todas as espécies de mamíferos, o desenvolvimento de folículos e oócitos segue uma sequência característica de eventos que começa com o estabelecimento do ovário e termina com a ovulação de um oócito fértil, em metáfase II (PICTON et al., 2008). O desenvolvimento folicular começa já no quarto mês da vida fetal. As células germinativas primordiais, neste momento, migraram do endoderma do saco vitelino para a crista gonadal, passando por divisões mitóticas. Uma vez chegando à crista gonadal, as oogônias entram na primeira divisão meiótica e se tornam oócitos primários. As células somáticas originárias da gônada primitiva (ou seja, células epiteliais de superfície, células da granulosa e da teca, células intersticiais, fibroblastos) circundam a oogônia, formando folículos ovarianos rudimentares (0,1 mm de diâmetro). Folículos contendo oócitos no estágio de dictióteno da meiose constituem a reserva folicular ovariana, que fornece o potencial reprodutivo por toda a vida da mulher (BAERWALD; ADAMS; PIERSON, 2012).

Os mecanismos subjacentes à progressão do desenvolvimento dos folículos primordiais humanos do estado de repouso para o estado de crescimento não são totalmente compreendidos. As evidências atualmente disponíveis indicam que o destino de cada folículo é dependente de um equilíbrio delicado entre a expressão e a ação de fatores que promovem a proliferação, crescimento e diferenciação das células foliculares e aqueles que promovem a apoptose; alguns folículos primordiais iniciam o crescimento enquanto outros permanecem quiescentes por meses ou anos. Os folículos pré-antrais (0,1 a 0,2 mm) desenvolvem-se independentemente do estímulo das gonadotrofinas. Quando alcançam um diâmetro de 0,2 a 0,4 mm, começa a desenvolver-se uma cavidade cheia de fluido (isto é, o antro) e os folículos tornam-se responsivos às gonadotrofinas. Os folículos podem evoluir para o estágio antral precoce ao longo da vida fetal e durante a infância, mas regridem. Na puberdade, a maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada resulta na liberação pulsátil do hormônio folículo-estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) da hipófise, que culmina no desenvolvimento cíclico

de folículos antrais $\geq 2\text{mm}$, início da ovulação e menstruação (BAERWALD; ADAMS; PIERSON, 2012).

Quando os folículos primários entram na fase de crescimento, seu tamanho aumenta, tanto pelo aumento do oócito quanto pela proliferação de células da granulosa, gerando folículos de múltiplas camadas (folículos secundários). Ao se unirem, a camada circundante de células do estroma se estratifica e se diferencia em duas partes: a parte externa é a teca externa e a parte interna é a teca interna. A partir de um diâmetro folicular de cerca de 0,15 mm em humanos, a teca interna inicia sua diferenciação epitelióide e o folículo é definido como um folículo pré-antral. Em humanos, os folículos passam do estágio pré-antral ao estágio antral precoce com um diâmetro folicular compreendido entre 0,18 e 0,25 mm. Através do acúmulo de fluido na cavidade antral e proliferação das células da granulosa e da teca interna (TIC), o folículo progride através dos estágios subsequentes de desenvolvimento até atingir um tamanho de 2 mm (figura 1). O tempo necessário para que um folículo cresça da fase pré-antral até um tamanho de 2 mm é de cerca de 70 dias (GOUGEON, 1998).

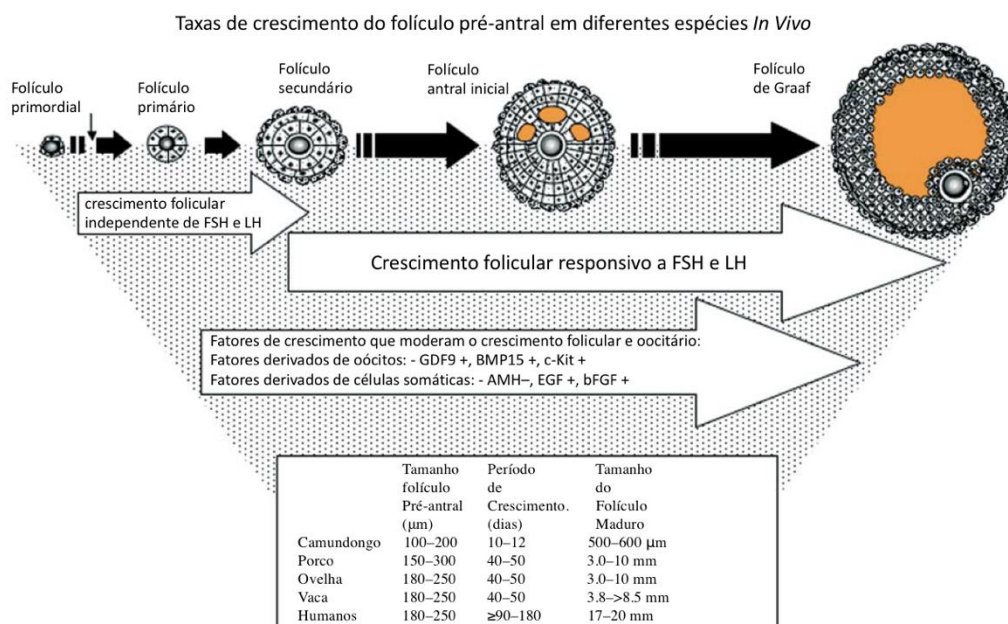


Figura 1: Representação diagramática dos reguladores e tempos de desenvolvimento dos folículos. Exemplos de importantes reguladores do crescimento de origem somática e oocitária. Os tamanhos dos folículos e as taxas de crescimento são aproximações para cada espécie. + indica estimuladores de crescimento; - indica inibidores do

crescimento; GDF9: Growth/differentiation factor 9 (fator de crescimento e diferenciação 9); BMP15: Bone morphogenetic protein 15 (Proteína morfogenética óssea 15); c-Kit: receptor tirosina quinase c-Kit; AMH: Anti-Müllerian hormone (hormônio anti-Mülleriano); EGF: Epidermal growth factor (fator de crescimento epidermal); bFGF: basic fibroblast growth factor (fator de crescimento de fibroblastos básico). Modificado de PICTON et al., 2008.

A competência dos oócitos é progressivamente adquirida na sequência de uma série coordenada de mudanças funcionais no gameta e nas células do cumulus. No entanto, não é até os últimos dias de desenvolvimento folicular que os oócitos adquirem a capacidade de passar pela progressão meiótica para a metáfase II. A redistribuição dos grânulos corticais e mudanças no número de mitocôndrias, na sua atividade e distribuição ocorrem durante os estágios finais de maturação oocitária. A maturação citoplasmática e nuclear do oócito é caracterizada ainda por uma cascata de eventos moleculares e pontos de verificação que incluem alterações na transcrição e tradução do RNA, replicação e reparo do DNA, condensação cromossômica, formação de fusos e desenvolvimento dos mecanismos para a penetração da cabeça do espermatozoide. A maturação dos oócitos é desencadeada pelo surto pré-ovulatório de gonadotrofinas e, particularmente, por níveis elevados de LH. A cascata folicular originada pelo pico de LH resulta em uma mudança na produção de esteroides das células da granulosa da predominância do estrogênio para um ambiente progesterogênico e na diminuição da concentração intracelular de AMPc (adenosina monofosfato cíclica) no oócito, que é induzida pelo menos em parte pela perda de contatos juncionais entre as células do cumulus e o oócito. A ativação das vias moleculares que levam à produção de ácido hialurônico pelas células do cumulus ocorre em resposta ao aumento de LH, que leva à mucificação e expansão do cumulus. A perda de contatos juncionais entre o oócito e as células somáticas, por sua vez, desencadeia a retomada da meiose nos oócitos maduros, pois reduz ainda mais as concentrações de AMPc, leva à inativação da proteína quinase A dependente de AMPc e reduz o efeito inibitório da influência das purinas na manutenção da parada da meiose (PICTON et al., 2008). A ovulação ocorre, em média, dentro de 24 h do pico de LH. As concentrações séricas de progesterona começam a subir após o pico pré-ovulatório de estradiol, mas antes do pico de LH, e

indicam o início da luteinização folicular (BAERWALD; ADAMS; PIERSON, 2012).

4 Proteína Ki-67

A proteína Ki-67 foi originalmente definida pelo anticorpo monoclonal Ki-67, que foi gerado pela imunização de camundongos com núcleos da linhagem celular de linfoma de Hodgkin L428. O nome é derivado da cidade de origem (Kiel) e do número do clone original na placa de 96 poços. Quando o antígeno foi caracterizado como uma proteína e a estrutura primária pôde ser deduzida a partir do cDNA correspondente, ele revelou-se sem homologia com qualquer polipeptídeo conhecido. Por este motivo e porque a função da proteína permaneceu desconhecida, o nome inicial Ki-67 foi mantido (SCHOLZEN T, 2000).

A caracterização do anticorpo Ki-67 revelou um padrão de coloração interessante. O anticorpo foi reativo com uma estrutura nuclear presente exclusivamente nas células em proliferação. Uma análise detalhada do ciclo celular revelou que o antígeno estava presente nos núcleos de células nas fases G1, S e G2 do ciclo celular, bem como na mitose. Células quiescentes ou em repouso, na fase G0, não expressaram o antígeno Ki-67. Como o antígeno Ki-67 estava presente em todas as células (células normais e tumorais), logo se tornou evidente que a presença dessa estrutura é um excelente marcador para determinar a fração de crescimento de uma dada população de células. Por esta razão, os anticorpos contra a proteína Ki-67 foram cada vez mais utilizados como ferramentas de diagnóstico em diferentes tipos de neoplasias (SCHOLZEN T, 2000).

Por muito tempo, a função exata do antígeno Ki-67 não foi conhecida. O antígeno é conservado em tecidos neoplásicos e normais de muitas espécies além do homem (por exemplo, cordeiro, bezerro, cachorro, coelho e rato). Argumentou-se que tal conservação evolutiva generalizada indica um papel importante na regulação da proliferação celular. O antígeno Ki-67 não é, no entanto, essencial para a proliferação celular. Foi relatada a proliferação em alguns híbridos celulares na ausência do antígeno Ki-67 (BROWN; GATTER, 1990).

Atualmente, o grupo de Booth e colaboradores, estudando a periferia dos cromossomos, relatou que alguns dos componentes periféricos mais conhecidos incluem as proteínas nucleolares fibrilarina, nucleolina, nucleofosmina, periferina e Ki-67 e que embora o papel da maioria destas proteínas na periferia do cromossomo mitótico tem recebido pouca atenção, o Ki-67 emergiu recentemente como um assunto particularmente ativo para estudos. O Ki-67 se redistribui a partir do córtex nucleolar e dos compartimentos fibrilares densos durante a intérfase, para a periferia do cromossomo durante a mitose. Como o antígeno não é detectado em células em repouso, estas características fazem do Ki-67 um dos melhores marcadores para avaliar a proliferação celular e ele é usado como um reagente para auxiliar na determinação do prognóstico para vários tipos de tumores, incluindo câncer de mama (BOOTH; EARNSHAW, 2017).

Além disso, Cuylen et al. observaram que a proteína Ki-67 serve como um surfactante para auxiliar na dispersão dos cromossomos durante a mitose. Eles relatam que o Ki-67, presente na periferia do cromossomo mitótico, evita que os cromossomos colapsem em uma única massa de cromatina após a desmontagem do envelope nuclear, permitindo assim a motilidade cromossômica independente e interações eficientes com o fuso mitótico. Ainda, a função de separação cromossômica do Ki-67 humano não está confinada dentro de um domínio proteico específico, mas se correlaciona também com o tamanho e a carga líquida de peptídeos truncados que aparentemente não apresentam estrutura secundária. Isto sugere que o Ki-67 forma uma barreira de carga estérica e eletrostática, similar aos agentes tensoativos (surfactantes) que dispersam partículas ou gotículas líquidas separadas por fases em solventes (CUYLEN et al., 2016).

5 Efeitos Tóxicos da Cisplatina no Tecido Ovariano

Em relação ao mecanismo molecular envolvido no efeito tóxico da quimioterapia, pouco é conhecido. Sabe-se que o processo ovulatório é controlado por uma série de eventos complexos que incluem mecanismos endócrinos, mensageiros celulares, proteases, quinases e ativação de enzimas

que são comparáveis aos eventos que ocorrem no processo inflamatório (HOLLAND; FINDLAY; CLEMENTS, 2001).

A cisplatina torna-se ativada assim que entra na célula. No citoplasma, os átomos de cloreto da cisplatina são substituídos por moléculas de água. Esse produto hidrolisado é um potente eletrófilo (cátion ou molécula com deficiência de elétrons - com orbital vazio para receber um par de elétrons) que pode reagir com qualquer nucleófilo (potencial doador de par de elétrons), incluindo o grupo sulfidril das proteínas e os átomos doadores de nitrogênio dos ácidos nucleicos. A cisplatina se liga ao centro reativo N7 nos resíduos de purinas e assim pode causar danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) nas células cancerígenas, bloqueando a divisão celular e resultando em apoptose. As ligações cruzadas das bases púricas com a cisplatina são as principais mudanças no DNA. Portanto, os estudos têm implicado o DNA como um alvo crítico para a citotoxicidade da cisplatina, evidenciando a hipersensibilidade à cisplatina em células procarióticas e eucarióticas deficientes no reparo ao DNA. Vários mecanismos moleculares que causam apoptose foram associados ao tratamento do câncer com a cisplatina (DASARI; BERNARD, 2014).

5.1 Estresse oxidativo induzido pela cisplatina

A exposição ao estresse oxidativo pode perturbar a função biológica normal. A cisplatina também induz espécies reativas de oxigênio que desencadeiam a morte celular, além de danos ao DNA. A morte celular ocorre pela ativação imediata de inúmeras vias de sinalização, enquanto que a definição exata das vias depende da célula. A formação de espécies reativas de oxigênio depende da concentração de cis-diaminodicloroplatina e do tempo de exposição. Espécies reativas de oxigênio em excesso podem induzir apoptose por ambas as vias extrínseca e intrínseca. Na via extrínseca da apoptose, espécies reativas de oxigênio são geradas pelo ligante Fas como um evento anterior à sua ativação via fosforilação, necessária para posterior recrutamento da proteína associada ao Fas e da caspase 8, bem como para a indução de apoptose. Na via intrínseca, as espécies reativas de oxigênio facilitam a liberação de citocromo C, ativando proteínas estabilizadoras de

poros (Bcl-2 e Bcl-xL), bem como inibindo as proteínas desestabilizadoras dos poros (proteína X associada ao Bcl-2, antagonista de Bcl-2). Um nível ainda mais alto de espécies reativas de oxigênio pode resultar em apoptose e necrose nas células cancerígenas. As espécies reativas de oxigênio também podem induzir a morte celular através da autofagia, que é um processo autocatabólico que envolve o sequestro de conteúdo citoplasmático (organelas exauridas e agregados proteicos), para a degradação em lipossomas (DASARI; BERNARD, 2014).

5.2 Citocinas Inflamatórias e a Ação da Cisplatina

Os efeitos inflamatórios da cisplatina foram melhor estudados nos rins, onde ela leva à insuficiência renal aguda. Nas células renais, a cisplatina induz a fosforilação e subsequente translocação do fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) ao núcleo, através da degradação da proteína inibidora $I\kappa\beta\alpha$. No núcleo, o NF- $\kappa\beta$ ativado leva à transcrição de mediadores inflamatórios incluindo o fator de necrose tumoral α (TNF- α). Por sua vez, o TNF- α induz a expressão de outras citocinas e o recrutamento de células inflamatórias para o tecido renal. O papel do NF- $\kappa\beta$ na insuficiência renal aguda (IRA) induzida pela cisplatina ainda está sendo estudado (OZKOK; EDELSTEIN, 2014).

Além da via do NF- $\kappa\beta$, outras vias inflamatórias foram definidas na fisiopatologia da IRA induzida pela cisplatina, como a poli [adenina difosforil-ribose] polimerase-1 (PARP-1) e vias de receptores toll-like (TLRs). De modo geral, o TNF- α e a interleucina 33 (IL-33) são citocinas pró-inflamatórias que medeiam a IRA induzida por cisplatina enquanto a interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória que protege contra IRA. As vias que levam à produção de citocinas como o NF- $\kappa\beta$ e o PARP-1 seguem sendo estudadas em detalhes (OZKOK; EDELSTEIN, 2014).

Células Inflamatórias do sistema imune, como linfócitos T, macrófagos, neutrófilos, e mastócitos estão presentes em infiltrados no tecido renal e desempenham um papel na indução de IRA por cisplatina. O papel fisiopatológico dos linfócitos T, principalmente das células T CD4 +, já foi bem estabelecido na indução da IRA por cisplatina. A IRA induzida pela cisplatina

está associada ao aumento da mieloperoxidase renal, que é produzida pelos neutrófilos e macrófagos. A presença de macrófagos no infiltrado renal foi observada no final do curso da IRA induzida por cisplatina. Contudo, a depleção de macrófagos não protegeu contra a IRA induzida por cisplatina. Quanto aos mastócitos, sabe-se que eles são capazes de secretar citocinas e quimiocinas essenciais para o recrutamento e adesão de leucócitos. Os mastócitos também são únicos porque armazenam o TNF- α pré-formado que pode ser libertado imediatamente após a degranulação. Nos rins, sugere-se que os mastócitos induzem a IRA pela cisplatina através da produção de TNF- α (OZKOK; EDELSTEIN, 2014).

Porém, até o momento não foram encontrados trabalhos avaliando a indução de citocinas inflamatórias e o aumento de outros marcadores inflamatórios pela cisplatina no tecido ovariano.

6 Sistema Calicreína-Cininas

As cininas têm um amplo espectro de atividades. São vasodilatadoras potentes e também promovem a diurese e a natriurese. As cininas protegem contra a lesão de isquemia-reperfusão, diminuindo a aderência endotelial dos leucócitos, levando à atenuação da aderência leucocitária pós-isquêmica, à atenuação do rompimento da barreira microvascular e à redução da lesão tecidual. Estudos recentes em humanos indicam um papel para as cininas endógenas na regulação do tônus vascular coronariano e na mediação dos efeitos hipotensores da inibição da enzima conversora de angiotensina (quininase II; ECA). No entanto, as cininas também participam das características essenciais da inflamação, produzindo vasodilatação, permeabilidade vascular, quimiotaxia de neutrófilos e dor (CAMPBELL, 2001).

As cininas consistem principalmente no nonapeptídeo bradicinina (bradykinin - BK, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), no decapeptídeo Lis-bradicinina ou calidina (kallidin -KD), e nos seus metabólitos carbóxi-terminais des-Arg, des-Arg⁹-BK (DABK) e des-Arg¹⁰-KD (DAKD), respectivamente. Existem duas vias clássicas para a geração de cininas: o sistema calicreína-cininas (SCC) plasmático e o tecidual (Figura 1). As cininas são originárias de

cininogênios (alto e baixo peso molecular), que são glicoproteínas circulatórias sintetizadas principalmente pelo fígado. A clivagem dos cininogênios pelas enzimas proteolíticas, as calicreínas, no plasma ou nos tecidos produz as cininas, BK e KD, respectivamente. Ambas BK e KD são peptídeos altamente instáveis e podem ser degradadas muito rapidamente por várias quinases, incluindo a enzima conversora de angiotensina (angiotensin converting enzyme - ACE), a endopeptidase neutra (neutral endopeptidase - NEP), a N carboxipeptidase (carboxypeptidase N - CPN) e a M carboxipeptidase (carboxypeptidase M - CPM). Estas quinases são divididas em dois tipos principais com base em sua enzimologia: cininase-I (CPN e CPM) e cininase-II (ACE). As enzimas cininase-I clivam a arginina carbóxi-terminal de BK ou KD, dando origem aos metabólitos ativos, DABK e DAKD, enquanto as cininases-II clivam o dipeptídeo C-terminal Phe-Arg. As cininas exercem seus efeitos biológicos pela ativação dos receptores, B1 (BKB1R) e B2 (BKB2R). Tanto BKB1R quanto BKB2R pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR) com sete domínios transmembrana, um amino terminal extracelular e um domínio carbóxi terminal intracelular. O BKB2R está constitutivamente presente em uma grande quantidade de tecidos periféricos, com alta afinidade por BK e KD (QADRI; BADER, 2018).

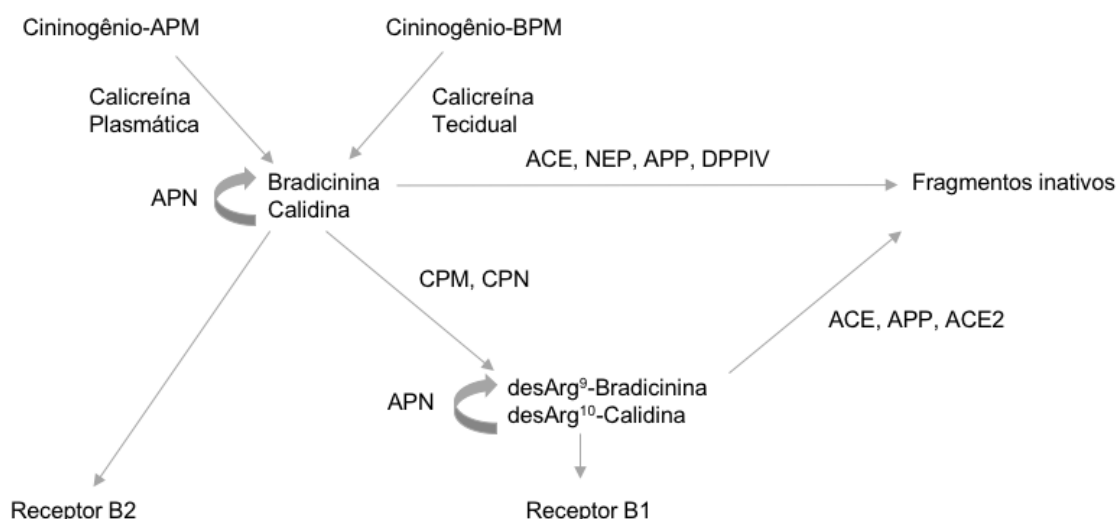


Figura 2: Geração e metabolismo das cininas. As cininas bradicinina (BK) e calidina (KD, Lis-bradicinina) são geradas a partir de cininogênios de alto peso molecular (APM) e baixo peso molecular (BPM) pela ação da calicreína plasmática e tecidual, respectivamente. Elas

interagem com o BKB2R e a KD pode ser convertida em BK pela N aminopeptidase (APN). Elas são degradadas pelas cininases I, carbóxi-peptidase M (CPM) ou N (CPN), para des-Arg⁹-bradicinina (DABK) ou des-Arg¹⁰-calidina (DAKD), respectivamente, que interagem com BKB1R. Todas as cininas são ainda degradadas em fragmentos inativos pelas cininases II ou pela enzima conversora da angiotensina (ACE) e pela aminopeptidase P (APP). Além disso, a endopeptidase neutra 24.11 (NEP) e a dipeptidilpeptidase IV (DPPIV) degradam BK e KD e a ACE2 degrada DABK e DAKD (modificado de QADRI; BADER, 2018).

6.1 Cininas, Maturação Folicular e Ovulação

Várias evidências apontam que os peptídeos, enzimas e receptores do sistema calicreína-cininas estão envolvidos no processo fisiológico de maturação folicular e ovulação (KIHARA et al., 2000). Kihara e colaboradores, demonstraram a presença de componentes do sistema produtor de bradicinina, bem como o produto bradicinina nos folículos ovarianos de suínos, sugerindo papéis importantes da bradicinina não apenas nos estágios iniciais do desenvolvimento folicular, mas também na ovulação (KIHARA et al., 2000).

Os receptores B1R e B2R de bradicinina são expressos nas células da granulosa e os níveis de bradicinina e calicreína aumentam no líquido folicular de folículos periovulatórios (ILHA et al., 2011). O tratamento com bradicinina em ratos fêmeas imaturos, fêmeas imaturas tratadas com gonadotrofina e ovários de ratos fêmeas maduras não provocou mudanças no nível de mRNA do receptor B2R. Os dados indicam que o nível de expressão do receptor B2R no ovário é bastante constante, e que o efeito biológico provocado pela bradicinina neste órgão pode depender das concentrações do ligante produzido pela ação do sistema calicreína-cininas (OHKURA et al., 2003). Plendl e colaboradores relatam que existe uma perspectiva de que as células da granulosa possam se ligar quimiotaticamente com as células endoteliais microvasculares ovarianas para iniciar e promover, por meio da cascata da calicreína, o processo de angiogênese. Eles observaram marcação imune das células da granulosa por anticorpos dirigidos contra calicreína tecidual e receptores de cininas em células da granulosa, sugerindo um papel para a cascata calicreína-cininas nos passos sequenciais que promovem a angiogênese do corpo lúteo (PLENDL; SNYMAN; BHOOLA, 2002).

7 Radicais Livres e Inflamação

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são formadas durante o metabolismo do oxigênio e são produzidas como subprodutos do metabolismo aeróbico. A produção de uma certa quantidade de ROS é necessária para a expressão gênica, sinalização celular e homeostase redox. Sistemas antioxidantes são indispensáveis para manter uma quantidade adequada de ROS. O equilíbrio entre a geração e eliminação de ROS é um fator chave necessário para quase todas as funções metabólicas em mamíferos. A manutenção desse equilíbrio é um importante processo constitutivo e influencia a proliferação celular, a diferenciação e a apoptose. Quando a produção de ROS ultrapassa a capacidade de eliminação dos antioxidantes, o estresse oxidativo ocorre. A perturbação deste equilíbrio pode resultar de um aumento da concentração de ROS ou da diminuição da capacidade de eliminação. Níveis excessivos de ROS são prejudiciais e podem resultar em acúmulo de danos oxidantes em compartimentos celulares distintos, exercendo efeitos tóxicos no DNA, nas proteínas e nos lipídios. Os danos mediados por ROS podem influenciar as funções fisiológicas, tais como vias de sinalização celular e vias de sinalização sensíveis ao status redox, levando a condições patológicas (WANG et al., 2017).

7.1 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás incolor e inodoro. Várias linhas de evidência mostraram que ele é um mensageiro fundamental envolvido em inúmeros processos. É uma molécula radical de curta duração sintetizada por uma família complexa de enzimas NO sintases (NOS). Ele é produzido pela oxidação e clivagem de um dos átomos de nitrogênio terminais do aminoácido L-arginina. As células dos mamíferos apresentam três genes que codificam isoformas distintas de NOS: NOS1, NOS2 e NOS3, que compartilham uma homologia de 51-57%. Estas isoformas possuem diferentes localizações teciduais, regulações e sensibilidade a inibidores. A NOS1, também conhecida como NOS neuronal (nNOS) (primeiramente isolada do tecido neuronal) e a NOS3 ou NOS endotelial (eNOS) (primeiramente encontrada no endotélio) são

constitutivas e ativadas por um aumento de cálcio, produzindo assim baixas concentrações transitórias de NO. De modo oposto, a NOS2 é uma isoforma de NOS induzível (iNOS) e independente de cálcio. Além dessas isoformas, uma NOS mitocondrial também foi descrita (BASINI; GRASSELLI, 2015).

O NO é sintetizado por muitos tipos de células envolvidas na imunidade e inflamação. Ele é importante como uma molécula de defesa, tóxica contra organismos infecciosos. Também regula a atividade funcional, o crescimento e a morte de muitos tipos celulares imunes e inflamatórias, incluindo macrófagos, linfócitos T, células apresentadoras de antígenos, mastócitos, neutrófilos e células natural killer. O NO não atua por meio de um receptor - sua especificidade de célula-alvo depende de sua concentração, sua reatividade química, a proximidade das células-alvo e o modo como as células são programadas para responder. Em altas concentrações, o NO é rapidamente oxidado em espécies reativas de óxido de nitrogênio (reactive nitrogen oxide species - RNOS), que medeiam a maioria dos efeitos imunológicos do NO. As RNOS podem nitrosar tióis para modificar as principais moléculas de sinalização, tais como quinases e fatores de transcrição. Várias enzimas-chaves na respiração mitocondrial também são inibidas pelas RNOS e isso leva a um esgotamento de ATP e energia celular. Uma combinação dessas interações pode explicar as múltiplas ações do NO na regulação das células imunes e inflamatórias (COLEMAN, 2001).

O NO tem uma meia-vida curta *in vivo* devido à sua reatividade com a hemoglobina e um amplo espectro de outros componentes biológicos. Como um radical livre, o NO pode reagir com outras moléculas. Além disso, várias biomoléculas podem reagir com NO, resultando em nitração (adição de NO₂), nitrosação (conversão em ácido nitroso HNO₂) e nitrosilação (adição de NO) (BASINI; GRASSELLI, 2015).

O NO e as espécies reativas de oxigênio exercem múltiplos efeitos moduladores sobre a inflamação e desempenham um papel fundamental na regulação das respostas imunes. Eles afetam praticamente todas as etapas do desenvolvimento da inflamação. Baixas concentrações de NO produzidas pela NOS constitutiva e neuronal inibem a expressão de moléculas de adesão, síntese de citocinas e quimiocinas e adesão e transmigração de leucócitos. Grandes quantidades de NO, geradas principalmente pela iNOS, podem ser

tóxicas e pró-inflamatórias. As ações do óxido nítrico, no entanto, não são dependentes primariamente da fonte enzimática, mas sim do contexto celular, da concentração de NO (dependente da distância da fonte de NO) e da ativação inicial das células imunes. De forma semelhante, o ânion superóxido produzido por NADPH oxidases presentes em todos os tipos de células que participam da inflamação (leucócitos, endoteliais e outras células vasculares, etc.) pode levar a efeitos tóxicos quando produzido em altos níveis, mas também modula a inflamação de um modo mais discreto, quando produzido continuamente em baixos níveis (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003).

A produção sustentada de NO pela iNOS ativada nos macrófagos é importante na defesa do hospedeiro contra infecções. Além disso, com base em estudos em animais e *in vitro*, foi demonstrado que o NO pode modular a função do sistema endócrino. Portanto, o NO funciona como um importante regulador da biologia e da fisiologia do sistema reprodutivo, onde atua na regulação de múltiplas funções dos órgãos reprodutivos tanto femininos como masculinos. Como exemplo, o NO está envolvido no controle da secreção de gonadotrofinas tanto por um efeito direto como através de um efeito regulatório sobre a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) hipotalâmico (BASINI; GRASSELLI, 2015).

Nos folículos ovarianos, o NO controla as principais atividades funcionais como o crescimento ou atresia, a angiogênese, a esteroidogênese e eventos ovulatórios. Além disso, ele representa um componente vital do microambiente dos oócitos, onde desempenha um papel fisiológico durante a sua maturação (BASINI; GRASSELLI, 2015). A síntese de NO participa do processo ovulatório, mas o excesso de NO pode prejudicar o processo de fertilização e implantação. Em células epiteliais endometriais humanas, demonstrou-se que o NO aumenta o estresse oxidativo e os níveis de apoptose (FAURE et al., 2014). Portanto, as alterações no sistema NO podem interferir com a dinâmica de crescimento folicular e com a fertilidade.

7.2 Superóxido Dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima responsável por catalisar a conversão do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Essa transformação é chamada de dismutação, que dá nome à enzima. A dismutação é uma reação entre duas moléculas idênticas na qual uma molécula é reduzida e a outra é oxidada, neste caso, 2 moléculas de ânion superóxido são convertidas em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Três isoformas de superóxido dismutase estão presentes em humanos. A SOD1 está localizada no citoplasma, a SOD2 nas mitocôndrias e a SOD3 é extracelular. A primeira é um dímero (consiste em duas subunidades), enquanto as demais são tetrâmeros (quatro subunidades). A SOD1 e a SOD3 contêm cobre e zinco, enquanto a SOD2, a enzima mitocondrial, tem manganês em seu centro reativo. A SOD dismuta o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e é a primeira linha de defesa contra espécies reativas de oxigênio (ROS) em reações antioxidantes. Nos ovários, a atividade da SOD se deve à isoforma extracelular secretada, já a SOD citosólica cobre/zinco (Cu / Zn-SOD) está localizada nas células da granulosa e da teca (SELEEM et al., 2014).

A ovulação é uma reação inflamatória autocontrolada, iniciada por uma secreção pulsátil de GnRH pelo hipotálamo para desencadear um aumento ovulatório do LH e do FSH (KALA; NIVSARKAR, 2016). Lalorya et al. relataram que o LH induz a SOD a produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que atua como substrato para a peroxidase desencadear a formação de progesterona por um mecanismo de radicais livres. Demonstrou-se que o LH induz um aumento na atividade da peroxidase no corpo lúteo, e sugeriu-se que o radical livre de ascorbato, produzido pela ação da peroxidase no ácido ascórbico, pode desencadear a oxidação da pregnenolona, originando assim, a rápida formação de progesterona. Isto resulta em uma mudança cíclica no nível de SOD durante o curso do ciclo reprodutivo, com níveis elevados durante o proestro (LALORAYA; KUMAR G; LALORAYA, 1988). As ROS e os antioxidantes desempenham um importante papel nas funções reprodutivas femininas. Observou-se que ROS estão envolvidas na maturação do oócito,

luteólise, produção de progesterona pelo corpo lúteo e ovulação (KALA; NIVSARKAR, 2016).

Kala e colaboradores, que estudaram o impacto do estresse nos subtipos de SOD durante o ciclo estral nos ovários, observaram que em camundongos normais, a expressão de SOD2 aumentou acentuadamente durante o proestro e diminuiu depois, enquanto a expressão de SOD1 permaneceu inalterada durante os estágios do ciclo estral. No entanto, em ratos estressados, a expressão de SOD1 e SOD2 aumentou significativamente durante as fases do ciclo estral. Esta mudança no nível da enzima pode perturbar a cascata inflamatória e ter um impacto negativo sobre a ovulação (KALA; NIVSARKAR, 2016). Já em um estudo com pacientes que apresentavam síndrome dos ovários policísticos (Polycystic ovary syndrome - PCOS), houve uma diminuição estatisticamente significativa tanto na média de SOD sérica quanto na atividade da SOD no fluido folicular das pacientes com PCOS comparadas com o grupo controle. Os níveis relativos de mRNAs da Cu, Zn SOD também foram significativamente menores em células isoladas do fluido folicular das pacientes com PCOS que no grupo controle (SELEEM et al., 2014). Tanto um aumento quanto uma diminuição nos níveis de SOD podem acarretar um desequilíbrio nos níveis de radicais livres e prejudicar a fertilidade.

7.3 Glutathiona

A glutathiona, um tripeptídeo tiol não proteico - γ -L-glutamil-L-cisteinil glicina, é um antioxidante celular encontrado em todos os tecidos de mamíferos. A glutathiona existe em duas isoformas: glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG). A GSH está presente nas concentrações de 1-10 mM nas células. A maior parte da GSH (90%) está presente no citosol, enquanto 10% da GSH das células está localizada nas mitocôndrias e menos de 1% encontra-se no retículo endoplasmático. A GSH, juntamente com as glutathiona peroxidases associadas e as glutathiona-S-transferases, desempenham um papel essencial nas mitocôndrias, onde é o único sistema antioxidante presente capaz de neutralizar o peróxido de hidrogênio. A catalase, outro antioxidante que é capaz de neutralizar o peróxido de hidrogênio, está presente em peroxissomos no citoplasma, mas não é

encontrada nas mitocôndrias. A capacidade da glutathiona de agir tanto como um nucleófilo (potencial doador de par de elétrons) como quanto um eletrófilo (cátion ou molécula com orbital vazio para receber um par de elétrons), permite que a GSH neutralize os ROS sem ser permanentemente consumida. Após a oxidação, a GSSG é reciclada de volta para GSH pela GSSG redutase às custas de uma nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) formando um ciclo redox. As defesas antioxidantes demonstraram ser importantes para a manutenção adequada da fertilidade e sugere-se que o estado redox module múltiplos estágios de maturação dos folículos ovarianos e a subsequente fertilidade (CINCO, 2016).

Em um estudo que avaliou o status oxidativo do ovário após o tratamento com outro quimioterápico, a ciclofosfamida, observou-se um aumento nos radicais livres, que se ligam covalentemente ao DNA e aumentam os sinais pró-apoptóticos. Estes sinais de morte celular permitem que o citocromo C saia da mitocôndria para o citosol e, em seguida, induza a caspase 9 a ativar a cascata da caspase (cisteína-ácido aspártico-protease) que leva à morte celular. A caspase 3 é uma enzima “efetora” que funciona nesta cascata para promover a morte celular. Ela está localizada no citoplasma das células do corpo lúteo, nas células da teca em folículos saudáveis e também nas células da granulosa dos folículos em apoptose. Como resultado, o citocromo C faz com que todas estas reações que prejudicam o estado antioxidante dos ovários, induzam à peroxidação lipídica e promovam a morte celular por apoptose (YENER et al., 2013).

Todas essas evidências demonstram a importância do sistema das cininas e do estresse oxidativo e sugerem que o tratamento com quimioterápicos possa alterar o mecanismo regulatório sobre o processo de ovulação. Dessa forma, entender como as cininas atuam em um modelo de infertilidade induzida por quimioterápicos pode ser útil, não só por revelar novas funções desses peptídeos, como também por auxiliar no manejo dos efeitos tóxicos da quimioterapia e no desenvolvimento de drogas capazes de proteger os ovários dos efeitos colaterais da cisplatina.

JUSTIFICATIVA

Este trabalho se justifica por buscar a verificação de como os componentes do sistema caliceína-cininas e do estresse oxidativo são modulados após um protocolo de quimioterapia com cisplatina semelhante ao utilizado em humanos. Atualmente, a criopreservação de tecido ovariano é a única forma possível de preservação da fertilidade em pacientes pré-púberes e em mulheres que necessitam iniciar imediatamente o tratamento para o câncer. No entanto, o transplante de tecido ovariano criopreservado não pode ser realizado quando há um risco de reimplantação de células malignas, como no caso das pacientes portadoras de leucemia. Portanto, novas opções devem ser desenvolvidas para as situações em que o transplante não é recomendável. Levando em consideração os aspectos moleculares da infertilidade induzida pela cisplatina, buscamos aumentar a compreensão sobre a participação do sistema das cininas e do estresse oxidativo nesse processo, a fim de permitir o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para a prevenção da infertilidade induzida pelo tratamento quimioterápico.

HIPÓTESES

Hipótese nula: os componentes do sistema calicreína-cininas e os marcadores do estresse oxidativo permanecem inalterados no tecido ovariano e no plasma após o tratamento com cisplatina.

Hipótese alternativa: os componentes do sistema calicreína-cininas e os marcadores do estresse oxidativo são alterados no tecido ovariano e no plasma pelo tratamento com cisplatina.

OBJETIVOS

Principal

Avaliar a participação dos componentes do sistema caliceína-cininas e de marcadores do estresse oxidativo em um modelo experimental de infertilidade induzida por quimioterapia em camundongos fêmeas.

Específicos

- Avaliar o peso corporal dos animais antes e após o tratamento.
- Avaliar o ciclo estral antes e após a quimioterapia para constatar a indução de infertilidade;
- Avaliar a histologia dos ovários do grupo tratado com quimioterápico em comparação com o grupo controle para verificação da estrutura ovariana e do número de folículos ovarianos;
- Avaliar a taxa de proliferação celular por imunohistoquímica para o marcador Ki-67 nos ovários dos animais tratados e comparar com os ovários dos animais controles.
- Avaliar a expressão dos receptores B1R e B2R de bradicinina nos ovários dos animais tratados ou não com o quimioterápico por Western-blot.
- Determinar a atividade da caliceína plasmática e da caliceína tecidual e glandular nos ovários dos animais tratados ou não com o quimioterápico.
- Avaliar os níveis de óxido nítrico, superóxido dismutase e glutatona reduzida no tecido ovariano dos animais tratados, comparando com os controles.
- Realizar a dosagem de N-acetil glicosaminidase e mieloperoxidase no tecido ovariano dos animais tratados e no grupo controle.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, R. A. et al. Endocrine late-effects of cancer treatment 2
Cancer treatment and gonadal function: experimental and established
strategies for fertility preservation in children and young adults. **THE LANCET
Diabetes & Endocrinology**, v. 8587, n. 15, p. 1–12, 2015.

BAERWALD, A. R.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Ovarian antral
folliculogenesis during the human menstrual cycle: A review. **Human
Reproduction Update**, v. 18, n. 1, p. 73–91, 2012.

BASINI, G.; GRASSELLI, F. Nitric oxide in follicle development and
oocyte competence. **Reproduction**, v. 150, n. 1–9, p. 1470–1626, 2015.

BOOTH, D. G.; EARNSHAW, W. C. Ki-67 and the Chromosome
Periphery Compartment in Mitosis. **Trends in Cell Biology**, v. 27, n. 12, p.
906–916, 2017.

BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki- 67: its use in
histopathology. **Histopathology**, v. 17, n. 6, p. 489–503, 1990.

CAMPBELL, D. J. The kallikrein-kinin system in humans. **Clinical and
Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, n. 12, p. 1060–1065,
2001.

CINCO, R. **Redox State and Ovarian Function**. [s.l.] UNIVERSITY OF
CALIFORNIA, IRVINE, 2016.

COLEMAN, J. W. W. Nitric oxide in immunity and inflammation.
International Immunopharmacology, v. 1, n. 8, p. 1397–1406, 2001.

CUYLEN, S. et al. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic
chromosomes. **Nature**, v. 535, n. 7611, p. 308–312, 2016.

DASARI, S.; BERNARD, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364–378, 2014.

DIEDRICH, K.; FAUSER, B. C. J. M.; DEVROEY, P. Cancer and fertility: strategies to preserve fertility. **Reproductive biomedicine online**, v. 22, n. 3, p. 232–48, mar. 2011.

FAURE, C. et al. Are Superoxide Dismutase 2 and Nitric Oxide Synthase Polymorphisms Associated with Idiopathic Infertility? **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, v. 21, n. 4, p. 565–569, 2014.

GOUGEON, A. Ovarian follicular growth in humans: Ovarian ageing and population of growing follicles. **Maturitas**, v. 30, n. 2, p. 137–142, 1998.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 54, n. 4, p. 469–487, 2003.

HOLLAND, A. M.; FINDLAY, J. K.; CLEMENTS, J. A. Kallikrein gene expression in the gonadotrophin-stimulated rat ovary. **Journal of Endocrinology**, v. 170, p. 243–250, 2001.

HONORATO-SAMPAIO, K. et al. Evidence that angiotensin-(1-7) is an intermediate of gonadotrophin-induced oocyte maturation in the rat preovulatory follicle. **Experimental physiology**, v. 97, n. 5, p. 642–50, 2012.

ILHA, G. F. et al. Characterization of the kallikrein-kinin system during the bovine ovulation process. **Peptides**, v. 32, n. 10, p. 2122–2126, 2011.

JENSEN, A. K. et al. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue : focus on

birth and perinatal outcome in 40 of these children. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 34, p. 325–336, 2017.

KALA, M.; NIVSARKAR, M. General and Comparative Endocrinology Role of cortisol and superoxide dismutase in psychological stress induced anovulation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 225, p. 117–124, 2016.

KIHARA, T. et al. Identification of components of the intrafollicular bradykinin-producing system in the porcine ovary. **Biol Reprod**, v. 62, p. 1160–1167, 2000.

LALORAYA, M.; KUMAR G, P.; LALORAYA, M. M. Changes in the levels of superoxide anion radical and superoxide dismutase during the estrous cycle of rattus norvegicus and induction of superoxide dismutase in rat ovary by lutropin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 157, n. 1, p. 146–153, 1988.

LUYCKX, V. et al. A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 4, p. 1149–1156, 2014.

MAHAJAN, N. Fertility preservation in female cancer patients: An overview. **Journal of Human Reproductive Sciences**, v. 8, n. 1, p. 3–12, 2015.

OHKURA, R. et al. Expression of Bradykinin B 2 Receptor in the Mouse Ovary Expression of Bradykinin B 2 Receptor in the Mouse Ovary. **Zoological Science**, v. 20, n. 7, p. 847–854, 2003.

OZKOK, A.; EDELSTEIN, C. L. Pathophysiology of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 17, 2014.

PICTON, H. M. et al. The in vitro growth and maturation of follicles.

Reproduction, v. 136, n. 6, p. 703–715, 2008.

PLENDL, J.; SNYMAN, C.; BHOOLA, K. D. Expression of the Tissue Kallikrein-Kinin Cascade in Granulosa Cells of the Ovary. **Biological Chemistry**, v. 383, n. December, p. 1917–1924, 2002.

QADRI, F.; BADER, M. Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 22, n. 1, p. 31–44, 2018.

SCHOLZEN T, G. J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J Cell Physiol**, v. 182, n. August 1999, p. 311–322, 2000.

SELEEM, A. K. et al. Superoxide dismutase in polycystic ovary syndrome patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 31, p. 499–504, 2014.

WANG, S. et al. The Role of Antioxidant Enzymes in the Ovaries. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 14, 2017.

YENER, N. A. et al. Effects of Spirulina on Cyclophosphamide-Induced Ovarian Toxicity in Rats : Biochemical and Histomorphometric Evaluation of the Ovary. **Biochemistry Research International**, v. 2013, p. 6, 2013.

ARTIGO EM INGLÊS

O artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Journal of Assisted Reproduction and Genetics, que possui fator de impacto 2.163 avaliado em 2016 e foi avaliada pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) com o nível qualis B2 na área medicina III em 2016.

Kallikrein-kinin system and oxidative stress in cisplatin-induced female infertility

Laura Silveira Ayres¹, Markus Berger Oliveira^{1,2}, Isabel Cirne Lima de Oliveira Durli^{1,2},
Cristiana Palma Kuhl¹, Paula Barros Terraciano^{1,2}, Jorge Almeida Guimarães², Eduardo Pandolfi
Passos^{1,2}, Elizabeth Obino Cirne-Lima^{1,2}

1. PPGGO/UFRGS, 90035-007 Porto Alegre, RS, Brazil
2. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence should be addressed to Laura Silveira Ayres; laura.ayres@gmail.com

Abstract (150-250 words)

Purpose Our objective was to understand the participation of the kallikrein-kinin system and oxidative stress in cisplatin-induced infertility, aiding in the development of new therapeutic alternatives.

Methods C57BL/6 adult female mice (n=9) received two rounds of 2.5 mg/kg cisplatin intraperitoneally for five days, with a seven-day recovery period between rounds. Control group (n=9) received 0.9% NaCl. Ovarian follicles were counted with hematoxylin and eosin staining. Ki67 marker was evaluated immunohistochemically. Biochemical tests and western blot were also performed.

Results After cisplatin protocol, estrous cyclicity was present in 100% of control mice and in 44.4% of cisplatin group. Control group presented a greater number of antral follicles (p=0.011) and total viable follicles (p=0.006). Cisplatin group presented a greater number of atretic follicles (p=0.014). Ki67 marker demonstrated similar proliferation rates between groups. Inflammation markers were increased in cisplatin group, including the generation of plasma kallikrein (p=0.003), the decrease of the activated partial thromboplastin time (p=0.02), increase in activity of soluble (p=0.002) and tissue (p=0.008) kallikrein, and in the expression of bradykinin receptors B1R (p=0.001) and B2R (p=0.001), myeloperoxidase (p=0.03) and N-acetylglucosaminidase (p=0.04). Oxidative stress markers were also increased in cisplatin group, with the higher nitric oxide production (p=0.01) and the decrease in superoxide dismutase (p=0.003) and reduced glutathione (p=0.01).

Conclusion The increase in kallikrein-kinin system activity and oxidative stress markers in ovarian tissue provided a better understanding of cisplatin-induced infertility and indicate possible alternatives for ovarian protection during chemotherapy, like kallikrein-kinin system inhibitors and antioxidants.

Keywords infertility model, chemotherapy, inflammatory cytokines, ovarian toxicity

Introduction

Cancer treatment can affect endocrine and reproductive functions. As a consequence, the loss of fertility is a major concern for patients. Over the last five decades, major advances in cancer treatment have resulted in a substantial increase in the number of young patients cured. With the increase in the number of long-term survivors, gonadal function and fertility have become important concerns for these people [1]. Different options for fertility preservation are available for cancer patients. Cryopreservation of embryos is a well-established procedure and mature oocytes cryopreservation is also an alternative to preserve the fertility of women at reproductive age. On the other hand, ovarian tissue cryopreservation is the only possible way of preserving fertility in prepubertal patients and in women who need to start cancer treatment immediately [2]. To date, more than 86 live births have been published in the literature after cryopreserved ovarian tissue autotransplantation [3]. However, cryopreserved ovarian tissue transplantation cannot be performed when there is a risk of reimplantation of malignant cells, as in the case of leukemia patients [2]. Therefore, new options should be developed for situations in which transplantation is not recommended.

Regarding the molecular mechanism involved in cisplatin induced toxic effect, little is known [4]. Cisplatin becomes activated once it enters the cell. In the cytoplasm, the chloride atoms of cisplatin are replaced by water molecules. In the nucleus, cisplatin binds to purine residues and thus can cause damage to deoxyribonucleic acid (DNA) in cancer cells, blocking cell division and resulting in apoptosis. Cisplatin also induces reactive oxygen species (ROS) that trigger cell death, as well as DNA damage. The formation of ROS depends on the concentration of cis-diaminodichloroplatin and the time of exposure [5]. Cisplatin inflammatory effects were best studied in the kidneys, where it leads to acute renal failure. In renal cells, cisplatin induces phosphorylation and subsequent translocation of the nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) to the nucleus. In the nucleus, activated NF- κ B leads to the transcription of inflammatory mediators including TNF- α . In turn, TNF- α induces the expression of other cytokines and the recruitment of inflammatory cells into the renal tissue [6].

It is well known that the ovulatory process is controlled by a series of complex events that include endocrine mechanisms, cellular messengers, proteases, kinases and activation of enzymes that are comparable to the events that occur in the inflammatory process [4]. Several recent evidences point out that peptides, enzymes and receptors of the kallikrein-kinin system are involved in the physiological process of follicular maturation and ovulation [7]. Kihara et al. demonstrated the presence of components of the bradykinin-producing system as well as the bradykinin product in ovarian follicles, suggesting important roles of bradykinin not only in the early stages of follicular development but also in ovulation [7]. In addition, bradykinin B1 and B2 receptors have been shown to be expressed in granulosa cells and bradykinin and kallikrein levels increase in the follicular fluid of periovulatory follicles [8].

As for ROS, the production of a certain amount of ROS is necessary for gene expression, cell signaling and redox homeostasis, but antioxidant systems are indispensable to maintain an adequate amount of ROS. The balance between generation and elimination of ROS is an essential factor needed for almost all metabolic functions in mammals [9]. A key component of redox homeostasis is nitric oxide (NO), a colorless, odorless gas. It is a messenger involved in countless processes and is synthesized by a complex family of NO synthases (NOS). In ovarian follicles, NO controls the main functional activities such as growth or atresia, angiogenesis, steroidogenesis and ovulatory events. In addition, it represents a vital component of the oocyte microenvironment, where it plays a physiological role during its maturation [10]. NO synthesis participates in the ovulatory process, but NO in excess can impair the fertilization and implantation processes. In human endometrial epithelial cells, NO has been shown to increase oxidative stress and apoptosis levels [11]. Superoxide dismutase (SOD), another important element of redox balance, is an enzyme responsible for catalyzing the conversion of superoxide into oxygen and hydrogen peroxide. It is the first line of defense against ROS in antioxidant reactions [12]. ROS and antioxidants play an important role in female reproductive functions. It has been observed that ROS are involved in oocyte maturation, luteolysis, progesterone production by the corpus luteum and ovulation [13].

Cisplatin toxicity is well understood in the renal, gastrointestinal, auditory and nervous systems, as well as in the bone marrow [14]. However, the mechanisms causing infertility induced by cisplatin are

poorly understood. To date, no studies evaluating the kallikrein-kinin system and oxidative stress in ovarian tissue after cisplatin treatment have been found. In this study, our objective was to increase the understanding of the participation of the kinin system and oxidative stress in this process, aiding in the development of new treatments and/or infertility preventive drugs.

Materials and Methods

This work was carried out in the Experimental Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). C57BL/6 adult female mice with eight weeks of age, transgenic for green fluorescent protein (GFP) were bred and maintained in the Animal Experimental Unit-HCPA. The mice were kept under controlled conditions of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and relative humidity ($55\% \pm 5\%$) with photoperiod of 12/12 hours and allowed free access to food and water. The transgenic lineage was chosen due to the possibility of comparison with future studies of our research group. In vivo procedures were carried out in accordance with current legislation in Brazil, Law 11.794 (08/10/2008), which establishes Procedures for the Scientific Use of Animals and regulates the registration of Experimental Centers. All procedures were based on the Brazilian Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific and Educational Purposes - DBCA (RN 30/2016). The euthanasia followed the guidelines indicated by the CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) Guidelines for Euthanasia Practice (2013).

Cisplatin Infertility Model

For infertility induction with cisplatin, the treatment group (n=9) received a modification of the protocol described by Sawhney et al. (2005) [15], which consists of five consecutive intraperitoneal daily applications of 2.5 mg/kg cisplatin in a final volume of approximately 0.05 mL, followed by a seven-day recovery period and a second series of 5 intraperitoneal applications of 2.5 mg/kg cisplatin. This protocol induces a subchronic exposure to cisplatin that mimics chemotherapy treatment regimens in the clinic [15,16]. The control group (n=9) received five consecutive daily intraperitoneal applications of 0.9% NaCl in a volume of approximately 0.05 mL, followed by a seven days interval and a second series of 5 intraperitoneal applications of 0.9 NaCl %. The animals were weighed daily to evaluate the impact of the treatment on feeding. For five days before and after cisplatin treatment, estrous cycle was evaluated. In the moment of euthanasia, blood specimens were acquired by cardiac puncture from each mouse and ovaries were collected. The death induction was performed through anesthetic overdose with inhaled isoflurane until the promotion of cardiorespiratory arrest. The death was confirmed by a veterinarian.

Histological analyzes

One ovary from each animal of the treatment and control groups was fixed in 4% paraformaldehyde (4°C overnight), dehydrated in ethanol, clarified in xylene and paraffin embedded. Histological sections of 6 μm of the ovary were obtained and stained with hematoxylin and eosin. The slides were analyzed by optical microscopy (Nikon Eclipse TE2000-U) for ovarian follicles count. Ovarian follicles were counted in each section. The viable follicles were classified into four types according to classification of McGee et al. (2000) [17]: a) primordial – containing an oocyte surrounded by a single layer of flattened cells, b) primary – characterized by a single layer of cuboidal pregranulosa cells, c) secondary – containing 2–5 complete layers of granulosa cells, d) tertiary – containing multiple layers of granulosa cells with some small antrum or Graafian – with the cavity occupying most of the total follicular volume. The follicles were considered atretic when demonstrated apoptosis signals in the oocyte and/or granulosa and thecal cells, changes in follicular shape (triangular shape) and presence of cells in follicular fluid. Each follicle was counted once, and the total number of each follicle types was registered. All tissue samples were evaluated by a single histologist who was blinded to the groups.

Immunohistochemical analysis

The ovarian specimens fixed in 10% buffered formalin, processed and included in paraffin, were submitted to histological cutting in a microtome set at 4 μm thickness. The sections were placed on previously silanized slides. In order to proceed with the immunohistochemical technique, the slides were heated in an incubator at 80° C for 30 minutes, dewaxed in xylol, rehydrated in ethyl alcohol and then in distilled water. Antigenic recovery was performed in a water bath for 20 minutes at 95° C in pH 6.0 citrate buffer and cooled for 10 min in the same buffer. Endogenous peroxidase activity was blocked with 5% hydrogen peroxide solution in methanol for 20 minutes. Protein blocking was performed with powdered skim milk diluted to 5% in PBS for 20 minutes. The sections were then incubated overnight in a refrigerator at 2-8° C with anti-Ki67 primary antibody (16667, Abcam) at a 1:200 dilution. After incubation, goat anti-rabbit secondary antibody (AP132P, Millipore) was applied at a 1:200 dilution and incubated for 1 h and 30 minutes at room temperature. The visualization of the reaction was obtained with liquid 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Dako, K3468), according to the manufacturer's recommendations. After visualization, the slides were counterstained in Harris hematoxylin for 10 seconds and differentiated in 2% ammoniacal water for 30 seconds. The slices were dehydrated in absolute alcohol and placed in xylol for the assembly of the slides in Entellan type resin. The ovarian slides were analyzed with ImageJ software (National Institutes of Health, USA) for Ki67 marked area quantification.

Estral Cycle Detection

Vaginal cytology evaluation was performed for five days (estral cycle period) before the start of chemotherapy protocol and for five days after the last day of chemotherapy treatment. Vaginal cytology analysis was according to CESCHIN et al. (2004) [18]. Vaginal smears were performed in the first hours of the clear cycle and two evaluators were involved in the analysis. The vaginal suspensions were collected with 0.1 mL of 0.9% saline. The slides were analyzed immediately after washing without any processing.

Biochemical Tests

One ovary of each mouse was used to determine the enzymatic activity of kallikrein. Ovarian samples were incubated and homogenized in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 containing 10 mM CaCl_2 . The kallikrein activity was monitored in a kinetic assay at 405 nm in spectrophotometer (SpectraMAX, Molecular Devices) after the addition of chromogenic substrate specific for the enzyme (S2302, H-D-Pro-Phe-Arg-pNA). Glandular and interstitial kallikrein activity also were determined in ovarian tissue through biochemical tests with commercially available kits (BioClin/Quibasa, Belo Horizonte, Brazil) and read in spectrophotometer (SpectraMAX, Molecular Devices).

Tissue NO concentrations were evaluated colorimetrically as its stable metabolites, nitrate and nitrite, by the Griess reagent method using a commercial colorimetric assay (BioVision, Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit, CA, USA). Tissue superoxide dismutase (SOD) (Cu/Zn SOD) levels were obtained according to the method of Sun et al. [19] using inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction with xanthine/xanthine oxidase as a superoxide generator. One unit of Cu/Zn SOD was described as the amount of protein that reduces the rate of NBT reduction by 50%. The tissue glutathione (GSH) concentrations were determined spectrophotometrically by the method of Beutler et al. [20]. In this system, glutathione is oxidized by 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB 10 mmol/l; Merck, Darmstadt, Germany), and then 2-nitro-5-thiobenzoic acid is formed, which can be detected spectrophotometrically by a change of absorption at 412 nm. Standard curves were constructed using reduced glutathione (0.25–10 mmol/l; Sigma, St Louis, MO, USA). Three standard solutions containing normal, medium and high GSH concentrations were analyzed.

The extent of neutrophil accumulation in ovarian tissue was measured by assaying myeloperoxidase (MPO) activity. MPO activity in the samples was tested by measuring the change in absorbance (optical density - OD) at 450 nm using tetramethylbenzidine (1.6 mM) and H_2O_2 (0.3 mM).

The reaction was terminated by the addition of 50 mL of H₂SO₄ (4 M). Results were expressed in mOD/min/mg of ovarian tissue.

Accumulation of mononuclear cells in ovarian tissue was quantitated by measuring the levels of the lysosomal enzyme N-acetylglucosaminidase (NAG) present in high levels in activated macrophages [21]. Samples were incubated for 10 min with 100 mL of p-nitrophenyl-N-acetyl-beta- D-glucosaminide (2.24 mM) prepared in citrate/phosphate buffer (39 mM pH = 4.5). The reaction was stopped by the addition of 100 mL of 0.2 M glycine buffer. The reaction product was detected colorimetrically and was performed at 400 nm. NAG activity was expressed as change in OD (mOD/min/mg of ovarian tissue).

Plasma samples were used to measure activated partial thromboplastin time (aPTT) and plasmatic kallikrein activity. Plasmatic kallikrein activity and aPTT levels were determined using commercially available kits (BioClin/Quibasa, Belo Horizonte, Brazil), following the manufacturer's recommended instructions. The absorbance was read using 96-well plates and the reads were performed using a SpectraMAX microplate reader (Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA).

Western Blot

The expression levels of B1R and B2R bradykinin receptors were detected by Western blot, according to Moraes et al. (2017) [22]. Briefly, ovarian samples from control mice (n=9) and from cisplatin treated mice (n=9) were pooled according to each group and tested in triplicate. Total protein content in the ovarian extracts was determined using the BCA method [23]. Ovarian samples were incubated and homogenized in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 containing 10 mM CaCl₂. Samples (30 g total protein) were resolved by 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Molecular weight standards were run in parallel to estimate molecular weights. Membranes were blocked with Tween-PBS (T-PBS) (PBS, 0.01% Tween 20) containing 1% bovine serum albumin (BSA) and probed with primary antibody (1:1000) overnight at 4° C. The membranes were rinsed with T-PBS and incubated for 1 h at room temperature with Horseradish Peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000). Immunoreactive proteins were visualized by enhanced chemiluminescent substrate (ECL) detection. The bands were quantified by densitometry with the use of ImageJ software (National Institutes of Health, USA).

Statistical analysis

The differences between body weights were analyzed with generalized estimates equations test. Ovarian follicles count and ki67 percentages of staining areas were evaluated with Mann-Whitney U test for independent samples. The remaining tests were analyzed with one-way or two-way analysis of variance followed by the Bonferroni test. The tests were considered statistically significant when p <0.05.

Results

In generalized linear models test, there was no statistically significant difference between body weights before and after treatment with cisplatin. The control group also showed no difference between body weights before and after saline injections. Likewise, there was no difference in body weight at any time in the comparison between groups (table 1).

As for vaginal cytology, smears in estrus, proestrus and metaestrus indirectly indicate estrogen hormonal influence, whereas smears in diestrus determine the absence of hormonal influence [18]. In the five days period before the beginning of treatment, all the mice, of both groups, presented smears in the estrogenic influence indicative phases (figure 1). During the five days period after the end of cisplatin protocol, all control group mice presented smears in the estrogenic influence, whereas cisplatin group presented 44.4% of the mice with estrous phases of estrogenic influence and 55.5%

remained in diestrus phase. On the other hand, only 2 (22.2%) of the mice that had estrogen influence, entered the estrous phase itself (figure 2).

Regarding the ovarian follicles count, there was no statistical difference between the control and cisplatin treated groups in primordial, primary and secondary follicular counts. However, there was a greater number of antral follicles ($p=0.011$) and total viable follicles ($p=0.006$) in the control group than in cisplatin group. In addition, cisplatin group had a greater number of atretic follicles than the control group ($p=0.014$) (figure 3).

In the immunohistochemical test for the cell proliferation marker Ki67, no statistically significant difference was observed between the groups with respect to the percentages of labeled areas (figure 4). On the other hand, there was an increase in the inflammation markers in cisplatin group, compared to the control group, as could be observed for the generation of plasma kallikrein through the kinetic test ($p=0.003$) and through the decrease of the aPTT ($p=0.02$) (figure 5). Likewise, the activity of soluble and tissue kallikrein in the ovarian tissue of cisplatin-treated animals was also increased in relation to control group ($p=0.002$ and $p=0.008$, respectively) (figure 6). Corroborating with these results, an increase in the expression of bradykinin B1R ($p=0.001$) and B2R ($p=0.001$) receptors was observed by Western blot in the ovarian tissue of cisplatin treated animals, compared to control. In addition, there was an increase in nitric oxide production in the ovaries of treated animals in relation to control ($p=0.01$) (figure 7).

Regarding neutrophil (MPO) and macrophage (NAG) markers, a higher concentration of both (respectively, $p=0.03$ and $p=0.04$) was observed in cisplatin treated animals, compared to those that received NaCl 0.9 % (Figure 8). In addition to these results, it was also observed through the increase in NBT reduction that SOD was at lower concentrations in the ovarian tissue of animals receiving cisplatin ($p=0.003$). Collaborating for the increase in oxidative stress, another antioxidant defense, GSH, was also shown to be decreased in mice receiving cisplatin ($p=0.01$) (figure 9).

Discussion

In this study, we analyzed inflammatory and oxidative stress markers in ovarian tissue and plasma from cisplatin-treated mice, in order to provide a better understanding of cisplatin-induced toxicity and infertility. In order to reproduce, as closely as possible, the effects of cisplatin treatment in ovarian tissue and fertility in general, we performed an animal model of cisplatin treatment that resembles that applied to humans [15,16]. In relation to cisplatin treatment, body weights before and after treatment were similar for both groups and also in the comparison of cisplatin with control group. Cisplatin gastrointestinal toxicity is well known and appears to be associated with the death of rapidly dividing cells in gastrointestinal tract [14]. Cisplatin also activates the chemoreceptor trigger zone and induces vomiting [14]. In addition, dietary intake is known to affect reproduction and chronically malnourished rats have a decrease in litter number [24]. When we first tested this chemotherapy protocol, there was an important statistically significant weight loss in cisplatin group ($p=0.000$ - unpublished data) and one mouse had to be euthanized before the end of the protocol due to weight loss and suffering. Then, in this study, mice that had very low body weight before the beginning of treatment were excluded from the study. In addition, when chemotherapy treatment started, both cisplatin and control groups received sunflower seeds daily until the end of the protocol as an alimentary supplement in order to avoid excessive weight loss, that could impact in fertility evaluations and in animal welfare. This result was expected and indicates that cisplatin protocol was not extremely aggressive.

Regarding vaginal cytology, during the five days period before the beginning of treatment, both groups presented smears with estrogenic influence phases, which was already expected and is an indication that the mice were fertile. In the five days period after the end of cisplatin protocol, all control group mice presented smears with estrogenic influence, while cisplatin group presented 44.4% of the mice with phases of estrogenic influence and 55.5% remained in diestrus phase. Only 2 (22.2%) of the mice entered the estrous phase itself. This was also an expected result, taking into account that platinum-based compounds such as cisplatin carry a medium risk of amenorrhea [25]. In a study evaluating

pregnancy rates after chemotherapy in male and female survivors of childhood cancer, female survivors, except for busulfan and high-dose lomustine, other alkylating drugs (including cisplatin) were not associated with reduced pregnancy or livebirth except at very high cumulative doses. But apart from that, female survivors still had a reduced likelihood of pregnancy and livebirth compared to their siblings and those who had not become pregnant by age 30 years, presented even lower likelihood of becoming pregnant by age 45 years than their siblings [26]. This demonstrates the moderate risk of infertility induced by cisplatin.

Concerning ovarian follicles count, there was no statistical difference between the groups in primordial, primary and secondary follicular counts. However, there was a greater number of antral follicles and total viable follicles in the control group. Also, cisplatin group had a greater number of atretic follicles. Taking into consideration that chemotherapy induces a reduction in ovarian reserve due to the apoptosis of growing follicles and activation of the resting follicles with further apoptosis, generating a burn-out effect [25,27], the similar counts in primordial, primary and secondary follicles can be explained by the activation of resting follicles pool, that is further degenerated by the chemotherapeutic agent. The differences in antral, total viable and atretic follicles is symptomatic of the ovarian damage caused by cisplatin. This is also a suitable explanation to the fact that there was no statistical difference in the percentages of labeled areas with the cell proliferation marker Ki67. Once the pathophysiological circle of follicles depletion is established, it reduces the secretion of estradiol and inhibin, which induce serum FSH concentrations to rise, leading to the recruitment of other follicles, which are also destroyed by chemotherapy [27]. So, it is expected to observe high cell proliferation rates also in cisplatin treated ovaries.

For the inflammation markers, there was an increase in generation of plasma kallikrein in cisplatin group, combined with a decrease in aPTT. Plasma kallikrein is a serine protease reported to activate factor XII, prourokinase, plasminogen, prorenin, neutrophils, and high-molecular-weight kininogen, resulting in bradykinin release. It also participates of the surface-mediated contact system of blood coagulation, the kinin-generating pathway, and inflammatory responses. Its deficiency in humans is characterized by prolonged aPTT [28]. This explains why the increase in plasma kallikrein was associated with a lower aPTT and exemplifies the generalized inflammatory reaction caused by cisplatin. All the inflammatory reactions seem to be activated with cisplatin treatment, once the activity of soluble and tissue kallikrein in the ovarian tissue of cisplatin-treated animals was increased, as well as the expression of bradykinin B1R and B2R. Cisplatin inflammatory-mediated toxicity is well known in its side effects such as bone marrow suppression, peripheral neuropathy, ototoxicity, and nephrotoxicity [6]. After a single dose of cisplatin (50–100mg/m²), approximately one-third of the patients develop nephrotoxicity [6]. In a study evaluating cisplatin-induced acute kidney injury, kinin B1 receptor was upregulated after cisplatin exposure, they also observed that kinin B1 receptor deficiency diminished the nephrotoxicity caused by cisplatin, ameliorated the inflammatory response and diminished apoptosis. In addition, kinin B1 receptor antagonist ameliorated renal function after cisplatin injection [29]. As the results demonstrate, the inflammatory reaction seems to be systemic and alter also the ovarian microenvironment. Kihara et al. demonstrated the presence of a BK-producing system in the ovarian follicles and suggested the physiological importance of this peptide in the early stages of follicular development and at ovulation [7]. Ohkura et al. suggested that the level of B2R expression in the ovary is maintained constant, and that the biological action of bradykinin may be dependent of ligand concentrations produced by the kinin-kallikrein system [30]. So, any kind of interference in this system, might be prejudicial and contribute to infertility development.

The increase in nitric oxide production in the ovaries of treated animals is another imbalance in hemodynamics induced by cisplatin. Khedr et al. observed elevated NO levels after a single dose of cisplatin [31]. Since NO plays an important role in the pathogenesis of cisplatin-induced toxicity and regulates a numerous physiological and pathological processes, including vascular tone, polymorphonuclear leukocytes adhesion and inflammation [31], NO concentrations must be well regulated. In the reproductive system, the ovulatory surge of luteinizing hormone (LH) induces a molecular machinery in which NO exerts a crucial role, at least in rodents and rabbits, mainly through the increase in prostaglandin production [10]. Also, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the

endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene were identified as genetic risk factors for endometriosis, preeclampsia and recurrent pregnancy loss [11]. For all these reasons, cisplatin-induced increase in NO synthesis seems to be collaborating to female infertility. As to neutrophil (MPO) and macrophage (NAG) markers, in the present study, a higher activity of both was observed in cisplatin treated animals. Numerous studies support an interdependent relationship between inflammation and oxidative stress [32–34]. During inflammatory process, the activated phagocytic cells like neutrophils and macrophages produce large amounts of ROS and reactive nitrogen and chlorine species, including superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl free radical, nitric oxide, peroxynitrite, and hypochlorous acid to kill the invading agents [32], further increasing oxidative stress and inflammation, in agreement with our results.

In addition to these results, NBT reduction supported the evidence that SOD presented lower concentrations in the ovarian tissue of animals receiving cisplatin, as well as another antioxidant defense, GSH, which was also decreased in this group. Glutathione is considered the chief natural antioxidant, as it is very effective in detoxifying and maintaining the cell redox state with the essential balance between ROS and antioxidants. Also, its presence is critical for oocyte maturation [35]. The delicate balance of ROS has different effects on the oocytes maturation, as an example, the physiological level of ROS (60–80 ng/oocyte) may induce meiotic division completion, but increased level of >80 ng/oocyte can be hazardous and evidence suggests that immature oocytes are more vulnerable to the harmful effect of free radicals, that can end causing cell arrest [35]. Regarding SOD, a peak of its activity appears during the proestrus phase, involving the lowest level of superoxide radicals compared with other estrous stages [9]. Both the amount and activity of the three SOD isoforms in follicular fluid are greater in small and medium follicles than in large antral follicles. Relatively decreased SOD activity in large follicular fluid is necessary to ensure that ROS levels reach a threshold value that is required for ovulation. However, excessive ROS production in preovulatory follicles may exert harmful effects to oocytes. An oocyte in the preovulatory follicle acquires developmental competence and a very active metabolism, and during this process, a large amount of ROS can be generated; thus, SOD1 is required to neutralize $O_2^{\bullet-}$ in the cytoplasm of oocytes. Therefore, SOD must be maintained at a certain concentration and activity level within the follicles to guarantee a balance between $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 for normal cellular function [9]. The imbalances shown in antioxidants seem to contribute to the ovarian oxidative stress presented by cisplatin treatment, so the use of antioxidant molecules may exert a protective effect to ovarian tissue during chemotherapy.

To conclude, this study presented the inflammatory reaction and oxidative stress induced by cisplatin in ovarian tissue, which was poorly understood so far. The increase in kallikrein-kinin system activity and oxidative stress markers point to possible alternatives for ovarian protection during chemotherapy regimens. Qadri et al. mentioned that in most cases, the pharmacological inhibition of BK B1R or its genetic deletion was beneficial for some diseases in animal models and that based on preclinical studies, BK B1R is a promising target for the treatment of inflammatory diseases, as well as other medications to interfere with the Kallikrein-kinin system, that should be studied in order to find therapeutic opportunities [34]. Estrela et al. also highlight the kinin B2 receptor antagonist treatment in amelioration of nephrotoxicity induced by cisplatin therapy [36]. The antioxidants are another open field to future studies with respect to ovarian protection, once sufficient evidence exists that oxidative stress can impair fertilization, implantation and embryo viability [35]. Another alternative for fertility recovery after chemotherapy may be the ovarian stem cells autotransplantation, since the results obtained in animal models suggested that the ovarian stem cells should be a candidate for future ovarian failure restoration [37], especially for patients with cancer with a high risk of malignant contamination to the ovaries (e.g. aggressive hematologic malignancies), that should not be considered eligible for ovarian tissue autotransplantation [38]. A great range of possibilities for future studies in this topic is available and the understanding of cisplatin pathophysiology in reproductive system is a vital aspect of this process.

Compliance with ethical standards

Ethical approval All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of Animal Use Ethics Committee - Hospital de Clínicas de Porto Alegre and the study was approved by the Committee with the number 17-0420.

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Anderson RA, Mitchell RT, Kelsey TW, Spears N, Telfer EE, Wallace WHB. Endocrine late-effects of cancer treatment 2 Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults. *LANCET Diabetes Endocrinol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;8587:1–12. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(15\)00039-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00039-X)
2. Luyckx V, Dolmans M, Vanacker J, Legat C, Moya CF, Donnez J, et al. A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold. *Fertil Steril*. 2014;101:1149–56.
3. Jensen AK, Macklon KT, Fedder J, Ernst E, Humaidan P, Andersen CY. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. *J Assist Reprod Genet. Journal of Assisted Reproduction and Genetics*; 2017;34:325–36.
4. Holland AM, Findlay JK, Clements JA. Kallikrein gene expression in the gonadotrophin-stimulated rat ovary. *J Endocrinol*. 2001;170:243–50.
5. Dasari S, Bernard P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* [Internet]. Elsevier; 2014;740:364–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
6. Ozkok A, Edelstein CL. Pathophysiology of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. *Biomed Res Int*. 2014;2014:17.
7. Kihara T, Kimura A, Moriyama A, Ohkubo I, Takahashi T. Identification of components of the intrafollicular bradykinin-producing system in the porcine ovary. *Biol Reprod*. 2000;62:1160–7.
8. Ilha GF, Santos JT Dos, Silveira AM Da, Gutierrez K, Gewehr CDCV, Oliveira SM De, et al. Characterization of the kallikrein-kinin system during the bovine ovulation process. *Peptides*. 2011;32:2122–6.
9. Wang S, He G, Chen M, Zuo T, Xu W, Liu X. The Role of Antioxidant Enzymes in the

Ovaries. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:14.

10. Basini G, Grasselli F. Nitric oxide in follicle development and oocyte competence. *Reproduction*. 2015;150:1470–1626.

11. Faure C, Julia C, Chavatte-palmer P, Leveille P, Dupont C, Sutton A, et al. Are Superoxide Dismutase 2 and Nitric Oxide Synthase Polymorphisms Associated with Idiopathic Infertility? *Antioxid Redox Signal*. 2014;21:565–9.

12. Seleem AK, Aziz A, Refaeey E, Shaalan D. Superoxide dismutase in polycystic ovary syndrome patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31:499–504.

13. Kala M, Nivsarkar M. General and Comparative Endocrinology Role of cortisol and superoxide dismutase in psychological stress induced anovulation. *Gen Comp Endocrinol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2016;225:117–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.09.010>

14. Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. Cisplatin: A review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol*. 2008;6:1–18.

15. Sawhney P, Giammona CJ, Meistrich ML, Richburg JH. Cisplatin-Induced Long-term Failure of Spermatogenesis in Adult C57/Bl/6J Mice. *J Androl* *J Androl*. 2005;2626:136–45.

16. Szturz P, Wouters K, Kiyota N, Tahara M, Prabhash K, Noronha V, et al. Weekly Low-Dose Versus Three-Weekly High-Dose Cisplatin for Concurrent Chemoradiation in Locoregionally Advanced Non- Nasopharyngeal Head and Neck Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Aggregate Data. *Oncologist*. 2017;22:1–11.

17. MCGEE EA, Hsueh AJW. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocr Rev*. 2000;21:200–14.

18. Ceschin AP, Biondo-Simões MDLP, Thomaz BAC, Totsugui J. Avaliação hormonal indireta e estudo da preservação folicular em tecido ovariano autólogo transplantado para região inguinal em ratos. *Acta Cir Bras*. 2004;19:27–30.

19. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988;34:497–500.

20. BEUTLER E, DURON O, KELLY BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* [Internet]. 1963 [cited 2018 Mar 25];61:882–8. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13967893>

21. Lamaita RM, Pontes A, Belo A V., Caetano JP, Andrade SP, Cândido EB, et al. Evaluation of N-acetylglucosaminidase and myeloperoxidase activity in patients with endometriosis-related infertility undergoing intracytoplasmic sperm injection. *J Obstet Gynaecol Res.* 2012;38:810–6.

22. Moraes JA, Rodrigues G, Nascimento-Silva V, Martins MR, Berger M, Guimarães JA, et al. Effects of *Lonomia obliqua* venom on vascular smooth muscle cells: Contribution of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Toxins (Basel).* 2017;9.

23. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76–85.

24. Alexander MH, Lazan KS, Rasmussen KM. Effect of chronic protein-energy malnutrition on fecundability, fecundity and fertility in rats. *J Nutr [Internet].* 1988;118:883–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3134524>

25. Mahajan N. Fertility preservation in female cancer patients : An overview. *J Hum Reprod Sci.* 2015;8:3–12.

26. Chow EJ, Stratton KL, Leisenring WM, Oeffinger KC, Sklar CA, Donaldson SS, et al. Pregnancy after chemotherapy in male and female survivors of childhood cancer treated between 1970 and 1999: A report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Lancet Oncol [Internet].* Elsevier Ltd; 2016;17:567–76. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)00086-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(16)00086-3)

27. Diedrich K, Fauser BCJM, Devroey P. Cancer and fertility: strategies to preserve fertility. *Reprod Biomed Online [Internet].* 2011 [cited 2014 Mar 31];22:232–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21269884>

28. Bird EJ, Smith PL, Wang X, Schumacher WA, Barbera F, Revelli JP, et al. Effects of plasma kallikrein deficiency on haemostasis and thrombosis in mice: Murine ortholog of the fletcher trait. *Thromb Haemost.* 2012;107:1141–50.

29. Estrela GR, Wasinski F, Almeida DC, Amano MT, Castoldi A, Dias CC, et al. Kinin B1 receptor deficiency attenuates cisplatin-induced acute kidney injury by modulating immune cell migration. *J Mol Med.* 2014;92:399–409.

30. Ohkura R, Kimura A, Kihara T, Ogiwara K, Ohkura R, Kimura A, et al. Expression of Bradykinin B 2 Receptor in the Mouse Ovary Expression of Bradykinin B 2 Receptor in the Mouse Ovary. *Zoolog Sci.* 2003;20:847–54.

31. Khedr NF. Protective effect of mirtazapine and hesperidin on cyclophosphamide-induced oxidative damage and infertility in rat ovaries. *Exp Biol Med*. 2015;240:1682–9.
32. Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox ? *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:9.
33. Honorato-Sampaio K, Pereira VM, Santos R a S, Reis AM. Evidence that angiotensin-(1-7) is an intermediate of gonadotrophin-induced oocyte maturation in the rat preovulatory follicle. *Exp Physiol* [Internet]. 2012;97:642–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22247282>
34. Qadri F, Bader M. Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. Taylor & Francis; 2018;22:31–44. Available from: <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1409724>
35. Mulla A Al, Fazari ABE, Elkhoully M, Moghaddam N. Role of Antioxidants in Female Fertility. *Open J Obstet Gynecol* [Internet]. 2018;8:85–91. Available from: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ojog.2018.82011>
36. Estrela GR, Wasinski F, Bacurau RF, Malheiros DMAC, Câmara NOS, Araújo RC. Kinin B2receptor deletion and blockage ameliorates cisplatin-induced acute renal injury. *Int Immunopharmacol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;22:115–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.06.025>
37. Terraciano P, Garcez T, Ayres L, Durli I, Baggio M, Kuhl CP, et al. Cell Therapy for Chemically Induced Ovarian Failure in Mice. *Stem Cells Int*. 2014;2014:8.
38. Lambertini M, Del Mastro L, Pescio MC, Andersen CY, Azim HA, Peccatori FA, et al. Cancer and fertility preservation: International recommendations from an expert meeting. *BMC Med* [Internet]. BMC Medicine; 2016;14:1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-015-0545-7>

Table 1 Body weight Average, standard error and 95% confidence interval of body weight according to specific evaluation moments

Time	Group	Average weight	Standard Error	95% Wald Confidence Interval	
				Inferior	Superior
Beginning estral cycle evaluation	control	17.29	0.40	16.50	18.09
	cisplatin	17.72	0.25	17.24	18.20
End of estral cycle evaluation	control	17.09	0.38	16.34	17.83
	cisplatin	18.30	0.27	17.78	18.82
Last day of the 1st round of cisplatin	control	16.72	0.39	15.95	17.48
	cisplatin	17.42	0.24	16.96	17.89
Last day of the 2nd round of cisplatin	control	17.68	0.48	16.73	18.62
	cisplatin	17.29	0.46	16.39	18.19
Euthanasia	control	17.97	0.59	16.80	19.13
	cisplatin	17.62	0.45	16.73	18.51

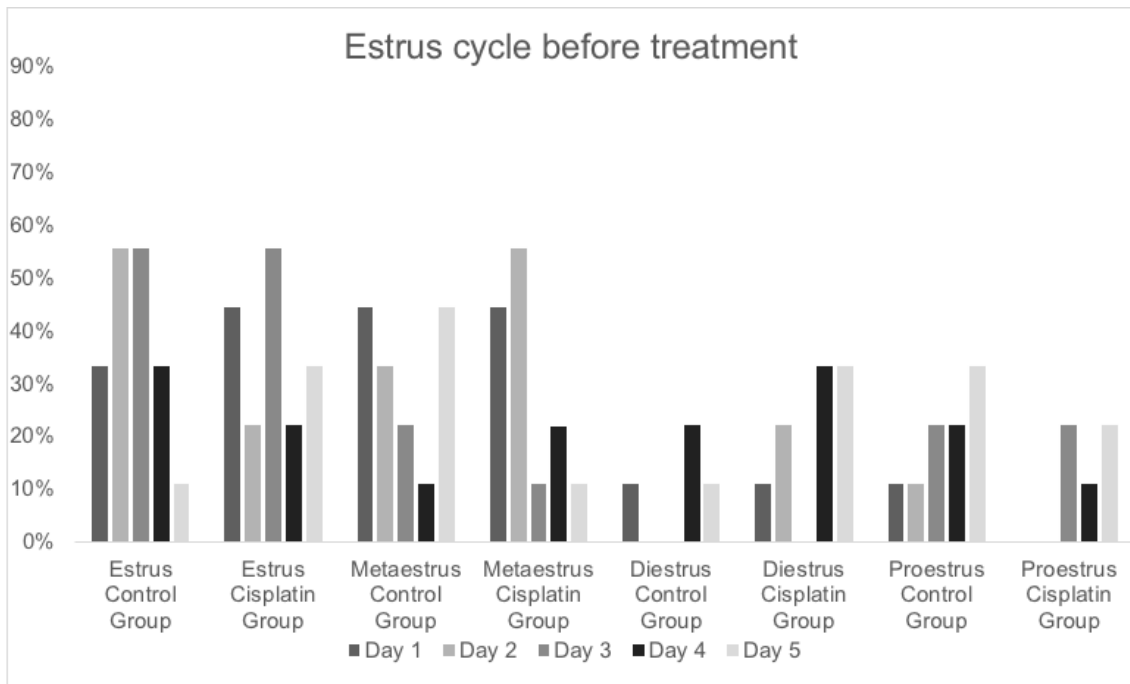


Fig. 1 Estrus cycle before treatment Individual percentage in each stage of estrus cycle during the five days before treatment beginning

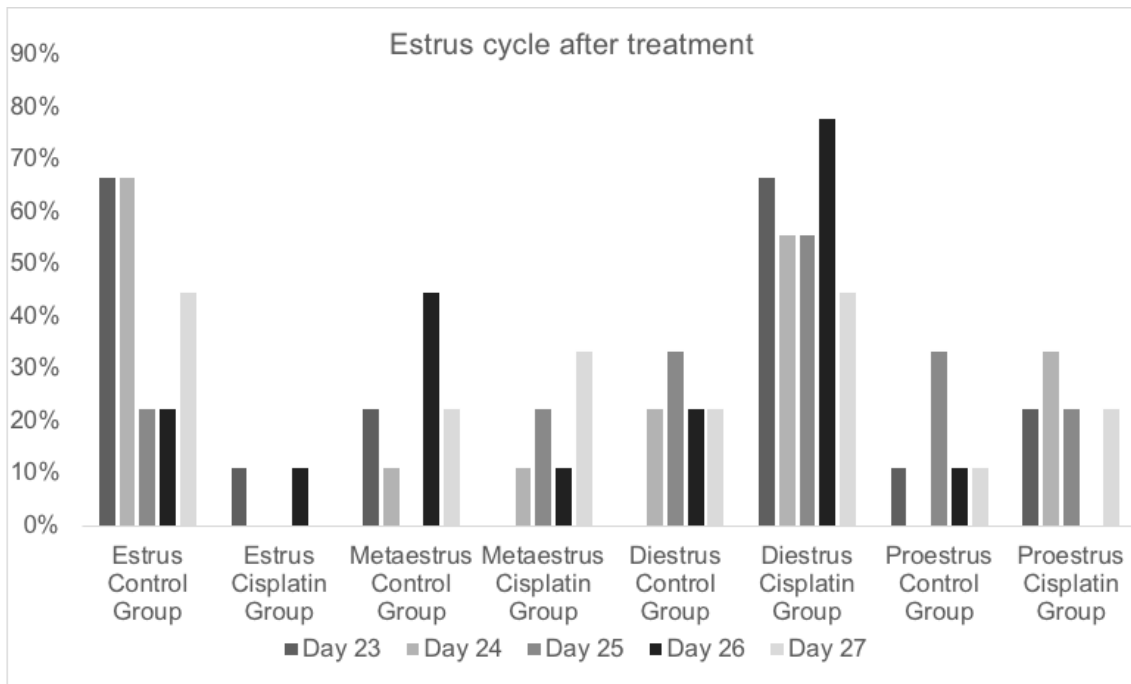


Fig. 2 Estrus cycle after treatment Individual percentage in each stage of estrus cycle during the five days after the end of treatment

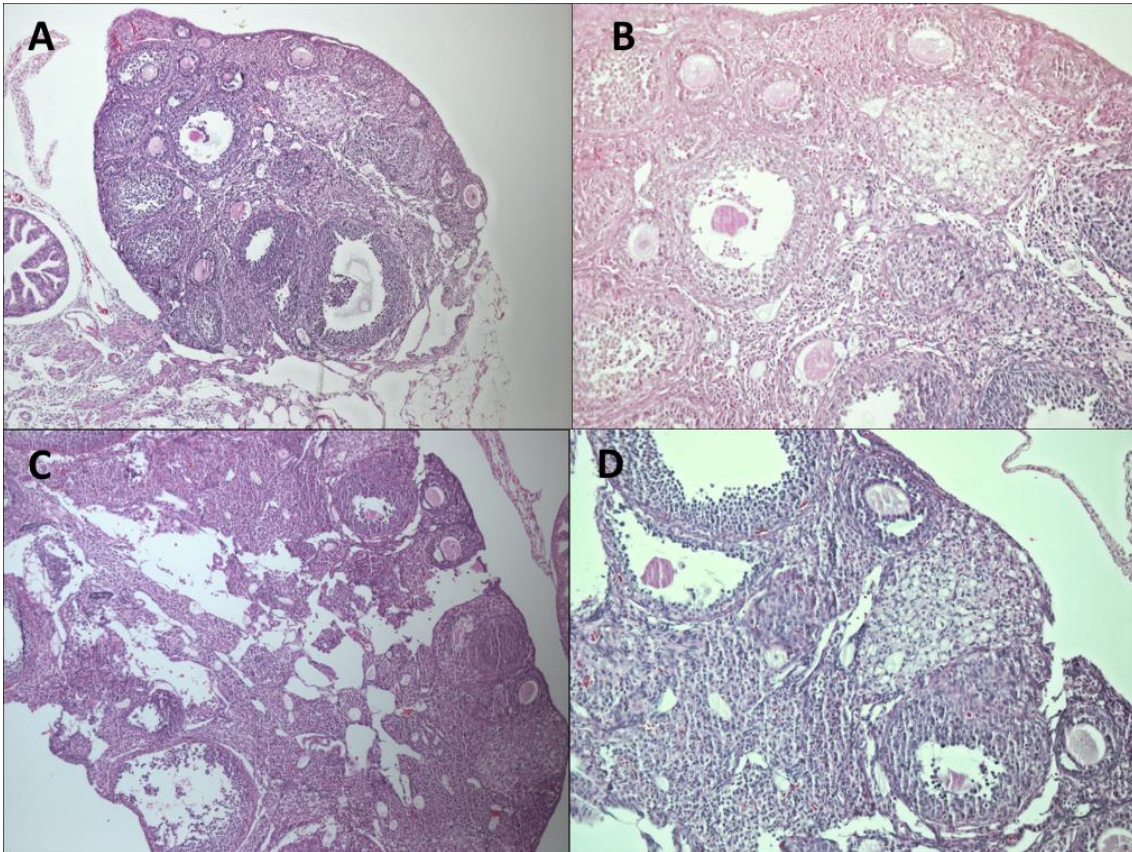


Fig. 3 Hematoxylin and eosin stained ovaries A. Control group 100x magnification. B. Control group 200x magnification. C. Cisplatin group 100x magnification. Cisplatin group 200x magnification.

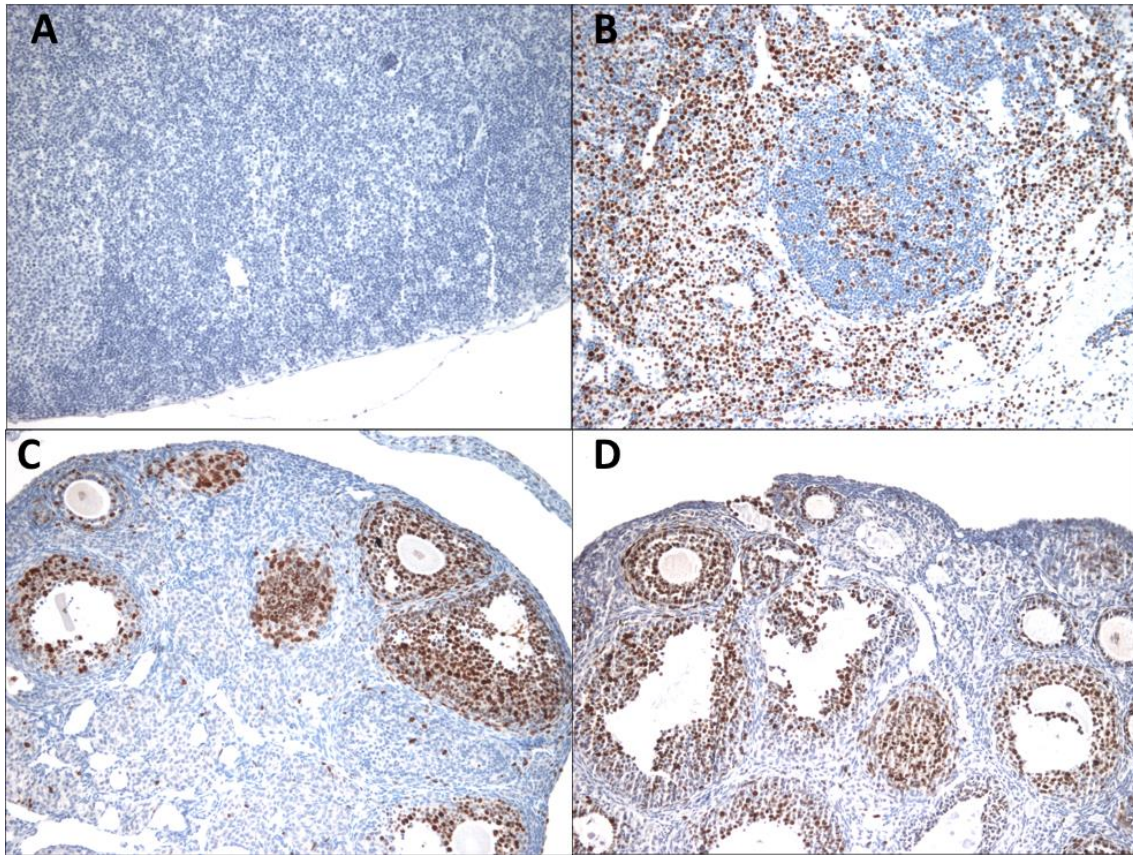


Fig. 4 Ki67 immunohistochemistry 200x magnification A. Negative control, did not receive primary antibody labelling. B. Positive control, mouse lymph node. C. Ovary from control group. D. Ovary from cisplatin-receiving group. There was no statistical difference between Ki67 labelled areas between the groups.

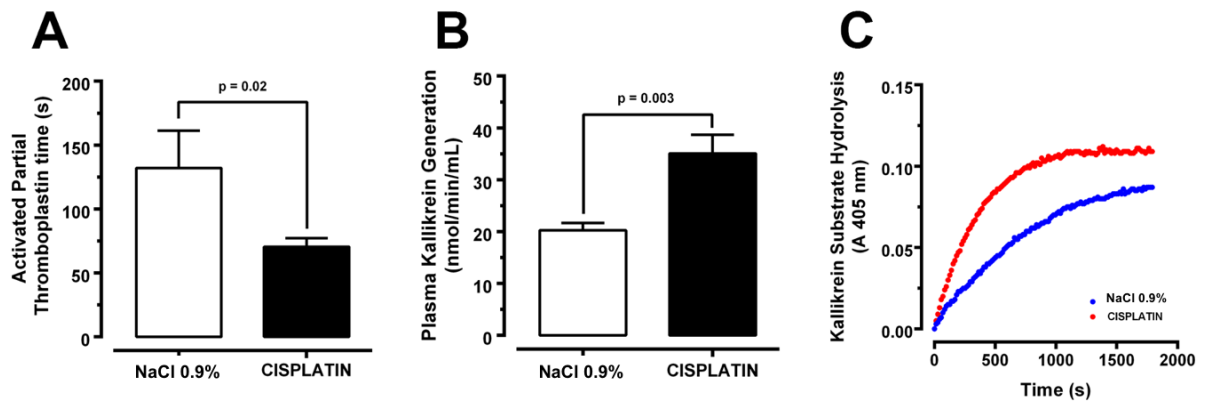


Fig. 5 Activated partial thromboplastin time and plasma kallikrein A. Activated partial thromboplastin time was lower in cisplatin group. B and C. Plasma kallikrein generation rate was greater in cisplatin group.

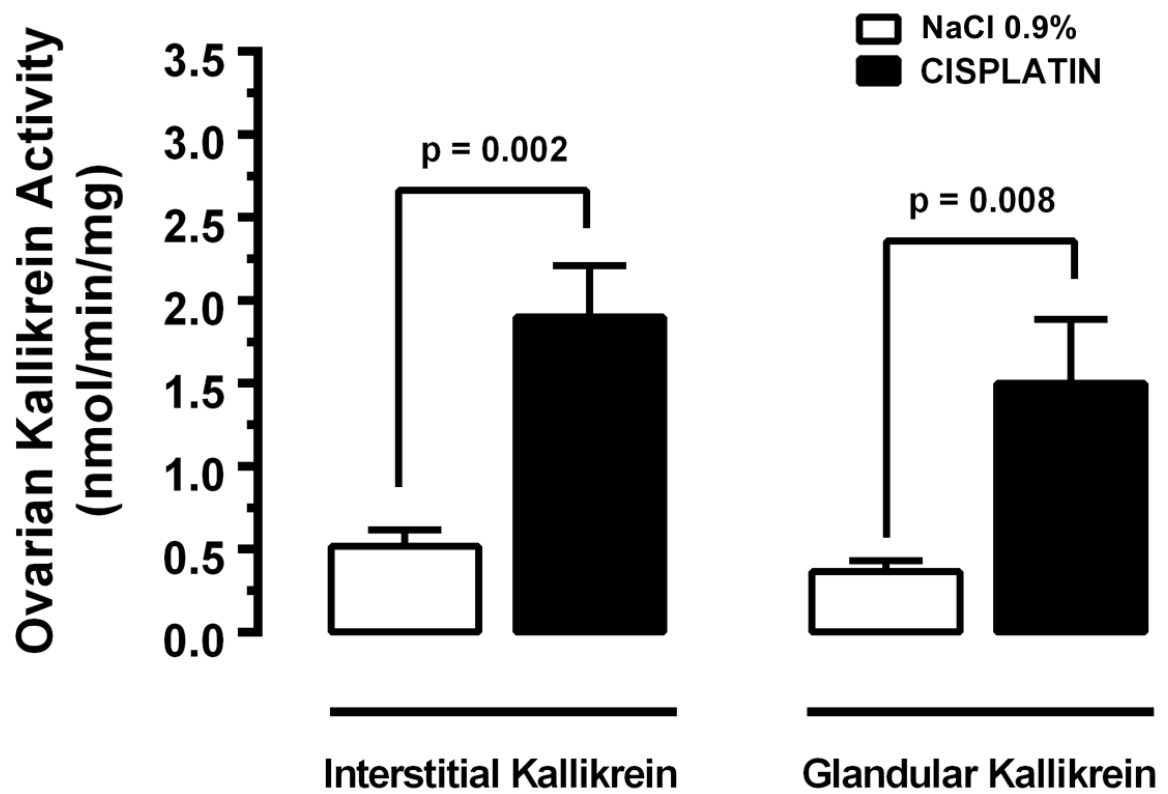


Fig. 6 Interstitial and glandular kallikrein Interstitial and glandular kallikrein activity were increased in cisplatin group in comparison with control group.

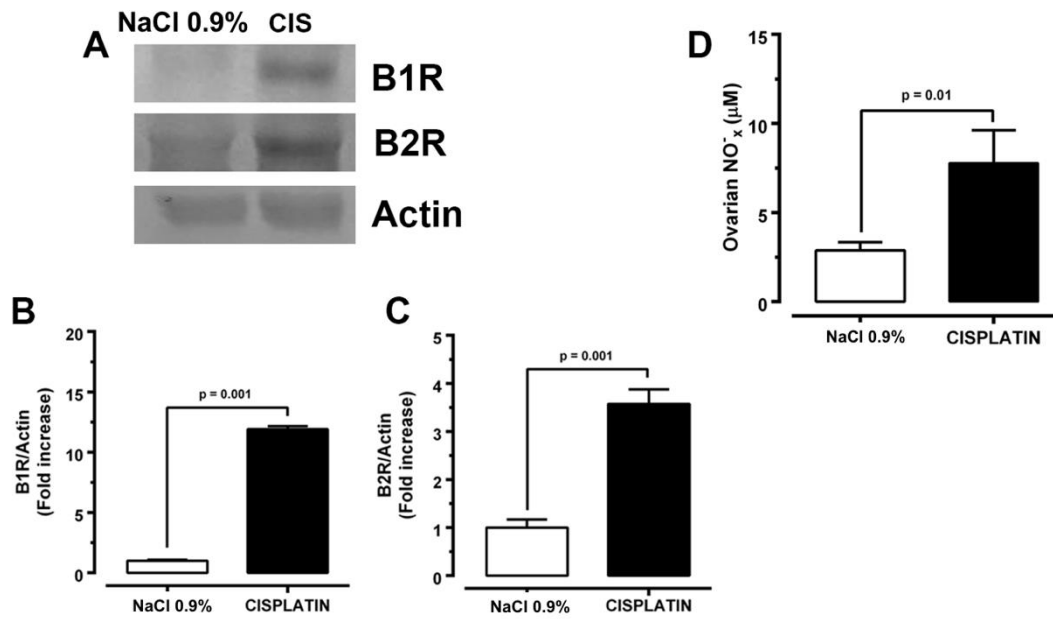


Fig. 7 B1R and B2R expression and ovarian NO A, B and C. B1R and B2R bradykinin receptors are overexpressed in ovarian tissue of cisplatin treated group in relation to control. D. Ovarian nitric oxide NO_x concentrations are also increased in cisplatin group, compared to NaCl 0.9% control.

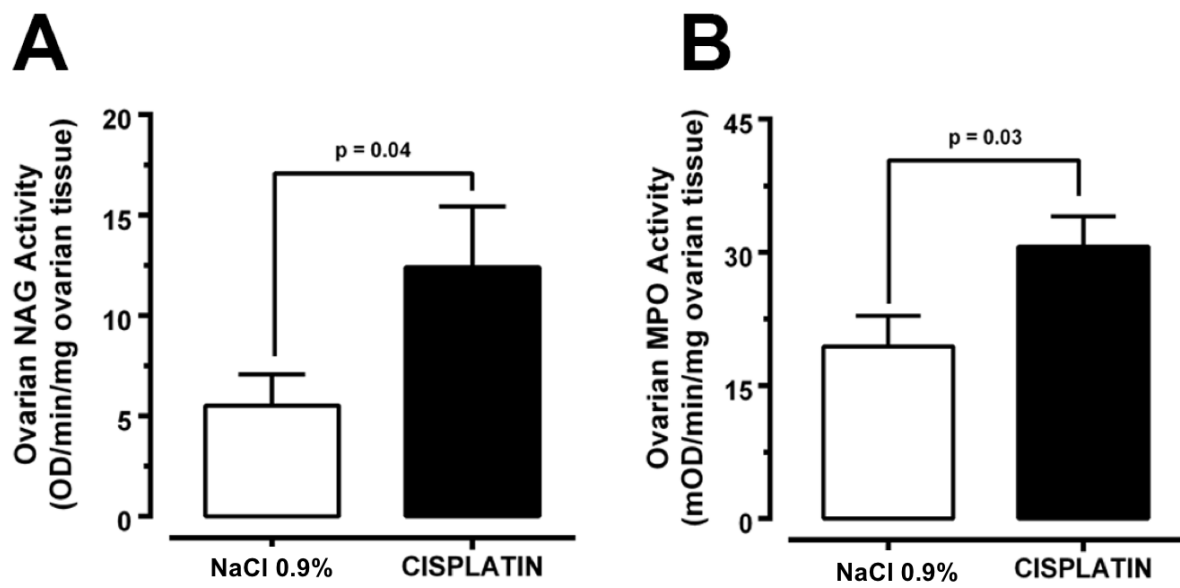


Fig. 8 NAG and MPO concentrations Neutrophils marker MPO and macrophages marker NAG presented higher concentrations in ovarian tissue from cisplatin-treated mice, compared to control.

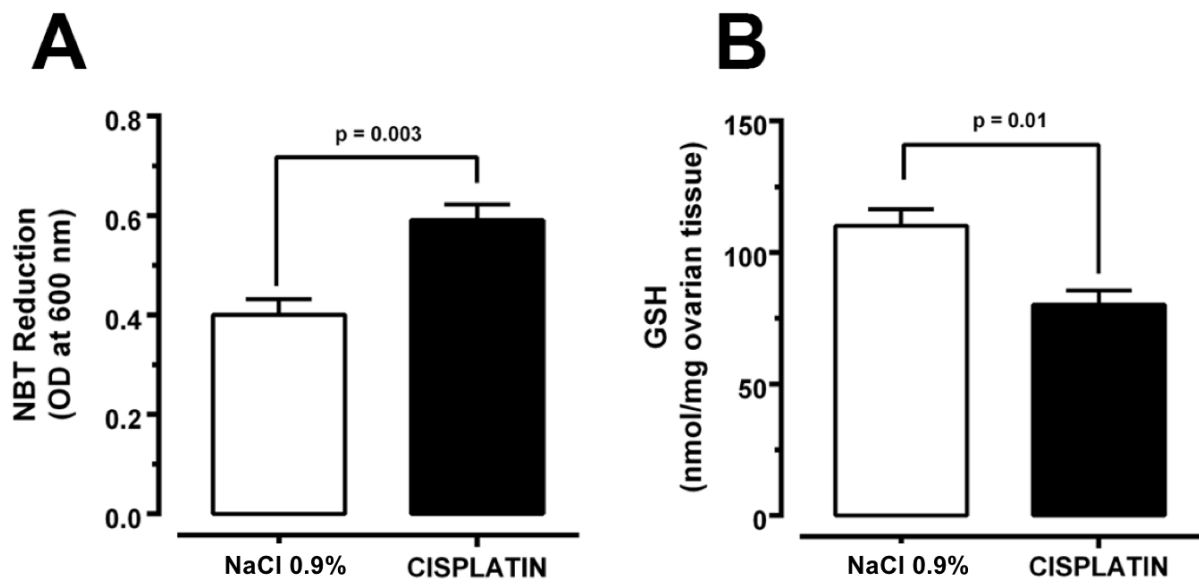


Fig. 9 SOD and GSH Antioxidant defenses SOD (lower NBT reduction) and GSH were lower in ovarian tissue of cisplatin-receiving mice, compared to NaCl 0.9% controls.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como conclusão, este estudo demonstrou que há um aumento nas reações inflamatórias e no estresse oxidativo induzido pela cisplatina no tecido ovariano, que até então não era bem compreendido. O aumento na atividade do sistema caliceína-cininas e nos marcadores de estresse oxidativo apontam para possíveis alternativas visando à proteção ovariana durante os tratamentos com quimioterápicos. O uso de antagonistas do BK B1R e do BK B2R, bem como outros medicamentos que interfiram com o sistema caliceína-cininas devem ser estudados como possíveis alternativas terapêuticas. Os antioxidantes são outro campo aberto para futuros estudos com relação à proteção ovariana, uma vez que existem evidências suficientes de que o estresse oxidativo pode prejudicar a fertilização, a implantação e a viabilidade dos embriões. Outra alternativa para a recuperação da fertilidade após a quimioterapia pode ser o autotransplante de células-tronco ovarianas, especialmente para pacientes com câncer de alto risco de contaminação maligna para os ovários (por exemplo, neoplasias hematológicas agressivas), que não devem ser considerados elegíveis para o autotransplante de tecido ovariano. Uma grande variedade de possibilidades para futuros estudos neste tópico está disponível e a compreensão da fisiopatologia da cisplatina no sistema reprodutivo é um aspecto vital deste processo.

PERSPECTIVAS

- Testar a utilização de inibidores dos receptores de bradicinina B1R e B2R e de antioxidantes *in vitro* e *in vivo*.
- Avaliar a preservação de células-tronco da linhagem germinativa após o tratamento com cisplatina.
- Avaliar se o tratamento com células-tronco da linhagem germinativa auxilia na recuperação da fertilidade após o tratamento com cisplatina em modelo animal.
- Testar a utilização de um tratamento combinando drogas ovário-protetoras e células-tronco da linhagem germinativa.